

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA BÁSICA
CURSO DE MESTRADO EM
MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA**

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE
Streptococcus pyogenes POR MEIO DE MARCADORES RAPD**

**CURITIBA
2006**

JULIANA NOSCHANG

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE
Streptococcus pyogenes POR MEIO DE MARCADORES RAPD**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Departamento de Patologia Básica e Patologia Médica, Universidade Federal do Paraná, para obtenção do título de Mestre, Área de Concentração: Microbiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ilma Hiroko Higuti.

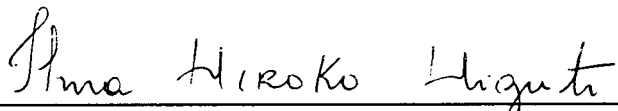
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Vânia Aparecida Vicente.

CURITIBA

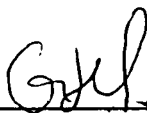
2006

PARECER

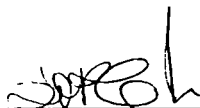
A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado “Estudo da variabilidade genética de isolados de *Streptococcus pyogenes* por meio de marcadores RAPD”, de autoria da Pós-Graduanda em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, JULIANA NOSCHANG, e com a Banca Examinadora constituída pelos Professores: Dr^a Ilma Hiroko Higuti (Departamento de Patologia Básica/UFPR) - Presidente, Dr^a. Chirlei Glienke-Blanco (Departamento de Genética/UFPR), Dr. Sérgio Olavo Pinto da Costa (USP), Dr^a. Vânia Aparecida Vicente (Departamento de Patologia Básica/UFPR) e Dr. Ricardo Lechtonen R. de Souza (Departamento de Genética/UFPR) - Suplente. Segundo a avaliação da Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado, a candidata foi aprovada. Para a devida publicação, o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas. Em Curitiba, 21 de fevereiro de 2006.



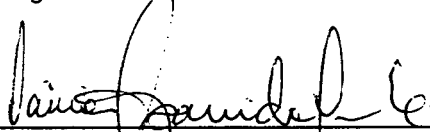
Prof^a. Dr^a. Ilma Hiroko Higuti (Presidente)



Prof^a. Dr^a. Chirlei Glienke-Blanco



Prof. Dr. Sérgio Olavo Pinto da Costa



Prof^a. Dr^a. Vânia Aparecida Vicente



Prof. Dr. Ricardo Lechtonen R. de Souza (Suplente)

*Dedico esta obra à minha família,
que esteve sempre presente,
fornecendo todo apoio e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

À Profª Dra. Ilma Hiroko Higuti e Profª Dra. Vânia Aparecida Vicente pela orientação, amizade e incentivo.

À Profª Dra. Chirlei Glienke pela contribuição e auxílio prestados.

À Dra Rosângela Stadnick Lauth de Almeida Torres pela colaboração.

Ao Profº Walter Boeger pela colaboração.

Ao colega e Profº Dr. Ricardo Lechtonen pela colaboração.

Ao amigo Raphael Orelis Ribeiro pelo apoio e presença constante.

Aos amigos do Curso de Mestrado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVO GERAL	2
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS E IDENTIFICAÇÃO	4
2.2 FATORES DE VIRULÊNCIA	6
2.3 PATOGENIA	8
2.4 COMPLICAÇÕES NÃO SUPURATIVAS	10
2.4.1 Febre Reumática	10
2.4.2 Glomerulonefrite	12
2.5 UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE SOROTIPOS DE <i>S. pyogenes</i>	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 AMOSTRAS	18
3.2 MEIOS DE CULTURA E REAGENTES QUÍMICOS: ANEXOS I E II	19
3.3 EXTRAÇÃO DE DNA	19
3.4 VARIABILIDADE GENÉTICA – RAPD	20
3.4.1 Amplificação do DNA por RAPD	20
3.4.2 Análise do Polimorfismo Obtido por RAPD	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5 CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS	33
ANEXOS	39

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - PROVAS UTILIZADAS NA CONFIRMAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS	19
FIGURA 2 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>S. pyogenes</i> UTILIZANDO O <i>PRIMER</i> OPA 9.....	23
FIGURA 3 - DENDROGRAMA GERADO A PARTIR DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE OS GRUPOS DE <i>S. pyogenes</i> UTILIZANDO O MÉTODO DE AGRUPAMENTO UPGMA	25
FIGURA 4 - DENDROGRAMA GERADO A PARTIR DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE OS GRUPOS DE <i>S. pyogenes</i> UTILIZANDO O MÉTODO DE AGRUPAMENTO WPGMA.....	26
FIGURA 5 - GRÁFICO TRIDIMENSIONAL REPRESENTANDO A ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS ENTRE OS ISOLADOS DE <i>S. pyogenes</i>	27

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - LINHAGENS DE <i>Streptococcus pyogenes</i> UTILIZADAS NO ESTUDO	18
TABELA 2 - SEQUÊNCIAS DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NO RAPD.....	20
TABELA 3 - ISOLADOS DE <i>S. pyogenes</i> PROVENIENTES DE PACIENTES RELACIONADOS AO SUPOSTO SURTO	22
TABELA 4 - AGRUPAMENTO DOS ISOLADOS DA PRIMEIRA E SEGUNDA COLETA DE ACORDO COM O DENDROGRAMA DA FIGURA 3.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATCC: *American Type Culture Collection*
- BHI: *Brain heart infusion* (infusão de cérebro e coração)
- CTAB: Brometo de cetiltrimetilamônio
- DNA: Ácido desoxirribonucléico
- dNTP: Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
- EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético
- NCCLS: *National Committee for Clinical Laboratory Standards*
- pb: Pares de bases
- PCR: *Polymerase Chain Reaction*
- RAPD: *Random Amplified Polymorphic DNA*
- rpm: Rotações por minuto
- TE: Tris-EDTA
- Tris: Tris-(hidroximetil)-aminometano
- µl: Microlitro

RESUMO

Os estreptococos β -hemolíticos do grupo A (*Streptococcus pyogenes*) causam várias doenças humanas e estão associados com febre reumática e glomerulonefrite pós-estreptocócica. A sorotipagem dos antígenos M e T tem sido a maneira mais comum de tipagem destes patógenos, entretanto, para alguns isolados a tipagem por este método não é satisfatória, pois cerca de 15 a 40% dos isolados não são tipáveis. Além disso, estes métodos de sorotipagem não são eficientes para diferenciação clonal em estudos epidemiológicos. Marcadores moleculares são ferramentas importantes capazes de diferenciar sorotipos de estreptococos do grupo A, provendo informações na elucidação de surtos epidemiológicos e diagnóstico. Marcadores RAPD foram utilizados para detectar polimorfismos em isolados de *S. pyogenes* de um surto de faringotonsilite estreptocócica ocorrido em uma indústria alimentícia, em março de 2004 na cidade de Curitiba - PR. Foram utilizados 26 isolados do surto, 11 isolados desta espécie, não relacionados com o surto, duas linhagens referências de sorotipo nefritogênico e uma de sorotipo reumatogênico. Foi observada variabilidade genética entre os isolados de *S. pyogenes* do surto. A análise de "cluster" utilizando-se o coeficiente de Jaccard, mostrou dois grupos de isolados sem relação clonal entre si, sugerindo a circulação de dois sorotipos na indústria alimentícia. Os resultados sugerem que o surto foi causado por sorotipo nefritogênico, com possibilidade de ter sido o sorotipo M4. A utilização de mais linhagens referências nefritogênicas e reumatogênicas e a sorotipagem da proteína M possibilitariam a identificação dos sorotipos causadores do surto de glomerulonefrite estreptocócica na indústria alimentícia, em Curitiba-PR, naquela ocasião.

Palavras chaves: glomerulonefrite estreptocócica; RAPD; *Streptococcus pyogenes*; variabilidade genética.

ABSTRACT

The group A β -hemolytic streptococci (*Streptococcus pyogenes*) cause a variety of human diseases. These bacteria are also associated with rheumatic fever and post-streptococcal glomerulonephritis. Although serotyping of M and T-type antigens has been the most common method to type these pathogens, this approach is unsatisfactory because 15 to 40% of the isolates cannot be typed. In addition, these serotyping methods are not efficient for clonal differentiation in epidemiological studies. Molecular markers are important tools to allow the differentiation of group A streptococci, providing information to investigate epidemiological outbreaks, as well as diagnostics. RAPD markers were used in the present study to detect polymorphism among isolates of *S. pyogenes* from an outbreak of pharyngotonsillitis in March of 2004 in a food processing industrial facility in Curitiba, State of Paraná, Southern Brazil. Analyses included 26 isolates from the outbreak, 11 isolates from the same species that were unrelated to the outbreak, two reference strains from the nephritogenic serotype, and one reference strain from the rheumatogenic serotype. Genetic variability was detected among the outbreak isolates of *S. pyogenes*. A cluster analysis using the Jaccard coefficient resulted in two non-clonal groups, indicating that more than one serotype was present during the outbreak. In addition, the results suggest that the outbreak was caused by the nephritogenic serotype (possibly M4). The use of a large number of nephritogenic and rheumatogenic reference strains, as well as M protein serotyping, would allow the identification of the serotypes that caused the outbreak of streptococcal glomerulonephritis in Curitiba.

Key words: Streptococcal glomerulonephritis; RAPD; *Streptococcus pyogenes*; genetic variability.

1 INTRODUÇÃO

Os estreptococos β -hemolíticos do grupo A de Lancefield, *Streptococcus pyogenes*, são cocos Gram positivos, agrupados aos pares ou em cadeias. São bactérias anaeróbias facultativas responsáveis por várias doenças, como a faringite estreptocócica, piodermite, erisipela, escarlatina, celulite, fasciite necrotizante, síndrome do choque tóxico, entre outras. Após faringites estreptocócicas não tratadas, podem ocorrer complicações não supurativas, como a febre reumática e a glomerulonefrite pós-estreptocócica (KONEMAN et al., 2001).

Apesar das infecções causadas por *S. pyogenes* terem declinado consideravelmente no fim da década de 60, nos últimos 15 anos tem havido um reaparecimento global de infecções invasivas por estreptococos do grupo A, tais como fasciite necrotizante e síndrome do choque tóxico estreptocócica (LAU et al., 2003; SMOOT et al., 2002).

O principal fator de virulência dos estreptococos do grupo A, a proteína M, apresenta regiões com similaridades e diferenças, classificando estes estreptococos em sorotipos diferentes (sorotipos M). A febre reumática é causada por sorotipos reumatogênicos, enquanto os nefritogênicos causam a glomerulonefrite pós-estreptocócica. A identificação destes sorotipos é importante para o estudo da epidemiologia, patogênese e terapia das infecções causadas por *S. pyogenes* (JOHNSON et al., 2002; KHANDKE et al., 1987; SINGLE e MARTIN, 1992; SEPPALA et al., 1994).

Apesar da sorotipagem dos antígenos T e M ser o método padrão utilizado para a identificação dos sorotipos de estreptococos do grupo A, existem isolados que não são tipáveis, pela inexistência de anti-soro específico (GONZÁLEZ-REY et al., 2003; YAN et al., 2003). Marcadores moleculares vêm sendo utilizados para estudos envolvendo *S. pyogenes*, tais como *Restriction Endonuclease Analysis* (REA), *Ribotyping*, PFGE (*Pulsed-field gel electrophoresis*), seqüenciamento do gene *emm* e RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*). Estas técnicas têm mostrado uma boa capacidade de diferenciação entre os sorotipos de estreptococos do grupo A. Marcadores moleculares, como RAPD,

evidenciam polimorfismos entre os isolados permitindo sua diferenciação, e possibilitam verificar se pertencem ao mesmo sorotipo. Por este motivo são amplamente utilizados em estudos epidemiológicos, além da facilidade da execução técnica, rapidez e menor custo do que a sorotipagem da proteína M (BERT et al., 1997; GONZÁLEZ-REY et al., 2003; OSTERLUND e ENGSTRAND, 1995; YAN et al., 2003; SEPPALA et al., 1994).

Dentro deste contexto, o presente estudo utilizou marcadores moleculares, RAPD, para avaliar a existência de variabilidade genética entre isolados de *S. pyogenes* de um surto de glomerulonefrite estreptocócica.

1.1 OBJETIVO GERAL

Estudo da variabilidade genética em *Streptococcus pyogenes* isolados de um surto de faringite estreptocócica ocorrido em março de 2004 em uma indústria de gêneros alimentícios em Curitiba – PR, por meio de marcadores RAPD.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilização de marcadores RAPD para estudo comparativo e análise da variabilidade genética entre as linhagens isoladas, detectando as marcas polimórficas presentes a partir dos perfis de RAPD obtidos.
- Verificação da existência de relação epidemiológica entre os isolados de *S. pyogenes* do surto de faringite estreptocócica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Antes da Segunda Guerra Mundial, *S. pyogenes* foi responsável por muitas mortes pós-parto e de pacientes queimados. Nas últimas quatro décadas, o mundo industrializado testemunhou um declínio na incidência das doenças por estreptococos do grupo A. Nos anos 70, pensou-se que as sérias infecções por estes estreptococos haviam sido completamente erradicadas nos países desenvolvidos. Na metade da década de 80, entretanto, a preocupação com doenças causadas por este patógeno cresceu em muitos países, devido a surtos de febre reumática ocorridos em diferentes áreas, além de casos de doenças sistêmicas com severas complicações. Esta ressurgência ocorreu nos países desenvolvidos e industrializados (KAPLAN, 1996; EFSTRATIOU, 2000; LAU et al., 2003; SMOOT et al., 2002).

O reaparecimento destas infecções e suas seqüelas pode ser atribuído a mudanças na epidemiologia de infecções precedentes por estreptococos, mudanças na suscetibilidade da bactéria a antibióticos comumente usados, e a mudanças na prevalência de sorotipos de maior virulência. Há algumas propriedades (por exemplo, um DNA fago) que são transmitidas a sorotipos receptivos e que podem causar um aumento na virulência das linhagens, tornando alguns sorotipos mais freqüentes (EFSTRATIOU, 2000; JOHNSON et al., 2002; KAPLAN, 1996; MELO et al., 2003).

A epidemiologia de infecções por estreptococos do grupo A e a disseminação de sorotipos dentro de uma população, ou entre duas ou mais populações, é um processo muito dinâmico. A introdução e disseminação dos diferentes sorotipos de estreptococos é imprevisível, e isto deve ser levado e conta na produção de vacinas. Como o objetivo de uma vacina para estreptococo do grupo A é conferir imunidade tipo-específica, a mudança na distribuição dos sorotipos deve ser considerada. A vacina é dirigida para epítomos conservados da proteína M ou produtos extracelulares (KAPLAN, 1996; KAPLAN et al., 2001).

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS E IDENTIFICAÇÃO

Os estreptococos foram primeiramente descritos por Louis Pasteur em 1879, que observou ao microscópio “contas em cadeias” em uma amostra de uma paciente com sepse puerperal (EFSTRATIOU, 2000). Os estreptococos são bactérias Gram-positivas, catalase-negativa e oxidase-negativa, pertencentes à família Streptococcaceae, que tendem a crescer aos pares e em cadeias. São anaeróbios facultativos e alguns crescem melhor em condições de anaerobiose. A composição da parede celular é similar a de outras bactérias gram-positivas, sendo formada por glicopeptídeo, no qual estão inseridos diversos carboidratos, ácidos teicóicos, lipoproteínas e proteínas antigênicas de superfície (KONEMAN et al., 2001).

O nome *Streptococcus* foi proposto por Rosenbach em 1884. Em 1903, Schotmüller relatou que numerosos organismos causavam mudanças em meio contendo sangue, e aqueles produzindo zonas claras de lise ao redor das colônias foram primeiramente chamados de *S. haemolyticus*, devido a beta-hemólise clássica produzida (EFSTRATIOU, 2000).

Rebecca Lancefield contribuiu grandemente para o conhecimento dos estreptococos, com a descoberta do polissacarídeo de grupo e da proteína M da parede celular. Estas moléculas antigênicas são a base para a tipagem destes organismos (EFSTRATIOU, 2000). Os estreptococos são classificados sorologicamente com base nos carboidratos antigênicos superficiais. Os antígenos detectados pelo sistema de agrupamento de Lancefield são polissacarídeos de parede celular (grupos A, B, C, F, G e outros) ou ácidos lipotécóicos de parede celular (grupo D e *Enterococcus*) (KONEMAN et al., 2001).

Os estreptococos do grupo A são classificados em tipos específicos, baseados na identificação dos antígenos T e M da parede celular. A tipagem convencional é baseada na especificidade antigênica dessas proteínas, utilizando antisoros tipo-específicos. A proteína T forma a base do sistema de tipagem por aglutinação e a proteína M por precipitação (EFSTRATIOU, 2000; YAN et al., 2003).

A identificação do *S. pyogenes* é feita mediante esfregaço de amostra biológica corado com Gram ou preparado a partir de cultivo de estreptococos. Estes esfregaços mostram cocos Gram-positivos dispostos em cadeias. O meio para cultura deve conter 5% de sangue de carneiro e sulfametoxazol (23,75µg/ml)-trimetoprim (1,25 µg/ml). O maior rendimento de cultivo positivo é obtido com meio seletivo incubado em condições anaeróbias durante 48h a 35-37°C. Utiliza-se a técnica de estria-punção para semear amostras de material de orofaringe em ágar sangue para o diagnóstico laboratorial de faringite estreptocócica, assim, a anaerobiose abaixo da superfície do ágar permite a máxima expressão da beta-hemólise das colônias (DYKSTRA et al., 1979; KONEMAN et al., 2001).

O sangue de animais é usado para enriquecer o meio de cultura e realçar a hemólise. O isolado cresce em ágar sangue de carneiro como uma colônia beta-hemolítica branco-acinzentada, convexa e com bordas contínuas, translúcida ou transparente e a sua superfície é brilhante ou fosca, de 0,5 a 1,0 mm de diâmetro após 24 horas de incubação. O halo de hemólise é geralmente igual a duas a quatro vezes o diâmetro da colônia (ANAND et al., 2000; KONEMAN et al., 2001 LAU et al., 2003).

A prova de hidrólise PYR é um teste presuntivo para estreptococos do grupo A e resulta positiva, podendo substituir a prova de sensibilidade à bacitracina. A enzima detectada é a pirrolidonil arilamidase. A suscetibilidade à bacitracina é um dos testes laboratoriais preliminares empregados na diferenciação presuntiva de *S. pyogenes* de outros estreptococos beta-hemolíticos. É realizada em placas de ágar sangue com um disco de bacitracina (0,04 unidade). A presença de um halo de qualquer tamanho em torno do disco é considerada prova positiva (KONEMAN et al., 2001; MALHOTRA-KUMAR et al., 2003).

Para os estreptococos do grupo A, a prova da hidrólise da arginina é positiva, variável para a esculina, negativa para hipurato e produção de acetoína (VP), positiva para fosfatase alcalina, negativa para alfa-galactosidase, variável para beta-glicuronidase, produção de ácidos de inulina e lactose; manitol, rafinose, ribose e sorbitol negativos; salicina e trealose positivas (KONEMAN et al., 2001).

O antígeno carboidrato específico de grupo existente na parede celular é extraído por meio de extração ácida ou enzimática, e solubilizado. A maioria dos

sistemas compactos comerciais utiliza métodos de aglutinação com látex ou ensaios imunoenzimáticos (EIA) (KONEMAN et al., 2001).

A anti-estreptolisina O (ASO) é o teste laboratorial mais comumente utilizado para determinar uma infecção anterior por *S. pyogenes* e seu estado evolutivo, enquanto que a determinação da velocidade de hemossedimentação sanguínea (VHS) e a proteína C reativa (PCR) podem indicar uma reação inflamatória recente. Em conjunto, podem ser utilizadas em estudos epidemiológicos, auxiliando tanto na investigação da infecção por *S. pyogenes*, quanto no diagnóstico da febre reumática (PRESTES-CARNEIRO et al., 2005).

S. pyogenes é sensível à penicilina, eritromicina e clindamicina por difusão em disco, método de Kirby Bauer, de acordo com os critérios NCCLS (LAU et al., 2003).

2.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

A capacidade do estreptococo do grupo A invadir tecidos é atribuída a vários fatores de virulência. Entre eles, a proteína M da parede celular, codificada pelo gene *emm*, é o fator antifagocítico mais importante, estando envolvida na patogenicidade do microrganismo, e, quando está ausente, este não sobrevive em sangue humano. Diferenças na estrutura desta proteína conferem a alguns sorotipos resistência ao soro imune (BRANDT et al., 2003; EFSTRATIOU, 2000; LAU et al., 2003).

A cápsula de ácido hialurônico também é antifagocítica, e, assim como a proteína M, está envolvida na necrose de tecidos, invasão e doença sistêmica causadas por *S. pyogenes* (KONEMAN et al., 2001; LAU et al., 2003).

Entre outros importantes fatores extracelulares estão o antígeno de parede, um polissacarídeo constituído de L-ramnose e N-acetil-D-glicosamina, na proporção de 2:1; fator de opacidade associado à proteína M; citolisinas; estreptolisinas O e S; fatores de disseminação como a hialuronidase, desoxirribonuclease, estreptoquinase, cisteína protease; antígenos T e R. Vários componentes extracelulares, como os associados à parede celular, tem sido reconhecidos como superantígenos; estes incluem as exotoxinas pirogênicas A, B, C, F e superantígeno estreptocócico. As exotoxinas pirogênicas dividem várias

atividades biológicas, como indução de febre, alteração da resposta imune, depressão do sistema reticuloendotelial e superantigenicidade. Há evidências de que a exotoxina pirogênica B contribui para a virulência do estreptococo do grupo A (EFSTRATIOU, 2000; KONEMAN et al., 2001).

Independente de qual tecido seja o sítio primário da infecção, o primeiro evento que o patógeno precisa realizar é a aderência às células do hospedeiro. O genoma do *S. pyogenes* apresenta numerosos genes que podem estar relacionados com a codificação de adesinas. As adesinas incluem proteína M, cápsula e proteínas ligadoras de fibronectina. A capacidade de aderência de um sorotipo pode variar dependendo do repertório de genes para adesinas que este possui e seu nível de expressão. Isto reflete as diferenças na capacidade para colonizar diferentes sítios (EDWARDS et al., 2003).

A proteína M é uma estrutura fibrilar flexível na superfície da parede celular bacteriana. É considerado o maior fator de virulência e confere resistência à fagocitose e proteção contra leucócitos polimorfonucleares. Proteínas M são moléculas diméricas, espiraladas, fixadas à superfície celular pela sua porção carboxila-terminal, de onde se projetam. A extremidade amino-terminal é uma região hipervariável e responsável pela especificidade do sorotipo. O terminal amino consiste de 30 a 100 resíduos de aminoácidos que dão origem a mais de 100 sorotipos de proteína M distintos. A região central da proteína M contém regiões de aminoácidos repetidos que variam em número e composição dentro e entre os sorotipos M. As variações nesta proteína diferenciam os estreptococos do grupo A em sorotipos M diferentes (KHANDKE et al., 1987; JOHNSON et al., 2002; SMOOT et al., 2002; TYRRELL et al., 2002).

A maioria dos anticorpos anti-proteína M, produzidos após infecção com estreptococos do grupo A, protegem contra futuras infecções pelo mesmo sorotipo; a imunidade adquirida em humano para qualquer sorotipo particular é tipo-específica (JOHNSON et al., 2002; KHANDKE et al., 1987).

Estudos epidemiológicos têm mostrado que nem todos os sorotipos M se comportam identicamente e que existem diferenças em sua predileção por sítios anatômicos. Certos sorotipos estão associados com surtos de febre reumática, enquanto outros estão associados com a glomerulonefrite aguda pós-estreptocócica. Existem similaridades e diferenças entre os vários sorotipos de proteína M. Desta maneira, os sorotipos M reumatogênicos e nefritogênicos

apresentam características estruturais distintas. As mudanças na distribuição dos sorotipos são responsáveis pelas mudanças na epidemiologia das doenças por estreptococos do grupo A. Isto justifica a importância dos estudos sobre a distribuição dos sorotipos nas populações.

Dos sorotipos classificados sorologicamente, o tipo M mais freqüentemente encontrado em casos de doença invasiva por estreptococos do grupo A é o M1, seguido de outros como M3, M28, M12 e M4. Os sorotipos M2, M4, M12, M49, M55, M57, M59, M60 e M61, têm sido associados com pioderma e glomerulonefrite aguda e os sorotipos M3, M5, M6, M18 e M24 estão associados com febre reumática (KHANDKE et al, 1987; OLIVIER, 2000; PEREA-MEJIA et al., 2002; TYRRELL et al., 2002).

2.3 PATOGENIA

Os estreptococos do grupo A podem colonizar quase todos os tecidos do organismo, mas o trato respiratório superior e lesões de pele servem como foco primário da infecção e reservatórios principais de transmissão (EFSTRATIOU, 2000; KAO et al., 2005).

Entre as doenças causadas por estes estreptococos estão as infecções pós-parto, bacteremia, fasciite necrotizante, celulite, miosite, sepse puerperal, meningite, pneumonia, escarlatina, síndrome do choque tóxico e as seqüelas não supurativas mediadas imunologicamente (febre reumática e glomerulonefrite pós-estreptocócica). Endometrite puerperal também pode ser causada por estreptococos do grupo A e, embora o número de casos tenha diminuído em países desenvolvidos durante as últimas décadas, severos surtos ainda ocorrem (BATZLOFF et al., 2004; EDWARDS et al., 2003; EFSTRATIOU, 2000; GONZÁLEZ-REY et al., 2003).

A transmissão se dá geralmente de pessoa a pessoa, através de secreções contaminadas, de contato direto com secreção nasal ou de garganta e do contato com a pele infectada ou exsudatos de feridas. Estreptococos do grupo A são disseminados através de gotículas respiratórias, desta forma podem facilmente causar surtos. O risco de contágio é maior quando uma pessoa que

está carregando a bactéria é sintomática (KAPLAN e SHET, 2004; SCHWEON e NOVATNACK, 2003; STEP et al., 1999).

Existem fatores implicados na patogênese das infecções por estreptococos do grupo A, incluindo depressão da imunidade do hospedeiro e a existência de linhagens mutantes altamente virulentas. Os fatores de risco para doenças invasivas causadas por estreptococos do grupo A incluem diabetes, alcoolismo, câncer, falência renal que necessita de diálise, infecção pelo HIV, falta de integridade na pele, cirurgia recente, aborto, parto, varicela antecedente em crianças, condições cardíacas ou respiratórias crônicas, corticosteróides e quimioterapia, queimaduras, uso de drogas intravenosas e condições que levem a um comprometimento do sistema imune (KAO et al. 2005; SCHWEON e NOVATNACK, 2003; STEP et al., 1999).

O *S. pyogenes* é responsável por casos de faringite em crianças pré-escolares e em idade escolar (15 a 30%) e também em adultos (5 a 10%). A maioria das faringites é de etiologia viral, mas somente para as faringites estreptocócicas é indicado tratamento com antibiótico, por causa da possibilidade de ocorrer complicações (ESPOSITO et al., 2004; GIESEKER et al., 2003; MENON et al., 2004; MICHEL et al. 1995; SCHWEON e NOVATNACK, 2003).

A faringite estreptocócica ocorre geralmente no inverno ou primavera, e entre os sinais clínicos observa-se a presença de febre, inflamação e dor na garganta, linfadenopatia cervical, dor de cabeça, dor de ouvido, *rash* e dor abdominal, algumas vezes com episódio de vômito. A tríade clínica da febre, faringite com exsudato e linfadenite cervical, sugere infecção estreptocócica, especialmente na ausência de tosse ou diarreia. As tonsilas estão geralmente aumentadas e com pontos purulentos ou pontos vermelhos escuros no palato mole (MARGIE, 1991; MICHEL, 1995; SCHWEON e NOVATNACK, 2003).

O diagnóstico de faringite causada por este microorganismo é complicado pela imprecisão de sinais e sintomas, sendo assim, deve ser feito com base nos resultados dos testes laboratoriais em conjunto com os achados clínicos e epidemiológicos. A confirmação laboratorial da faringite por *S. pyogenes* é necessária, uma vez que não é possível diferenciar clinicamente as faringites virais das causadas por este microorganismo (GIESEKER et al., 2003).

A faringite estreptocócica pode ser auto-limitada, com resolução dos sintomas dentro de três a quatro dias após o início da infecção. O tratamento é

realizado com uma única dose intramuscular de penicilina G Benzatina ou penicilina V Potássica. Pacientes alérgicos à penicilina podem ser tratados com um antibiótico macrolídeo como a eritromicina. A identificação e subsequente tratamento dos pacientes com faringite estreptocócica podem evitar a disseminação dos estreptococos, reduzir a morbidade causada pela doença e permitir ao paciente o retorno à escola ou trabalho (GERBER e SHULMAN, 2004; KAPLAN e SHET, 2004; SCHWEON e NOVATNACK, 2003).

2.4 COMPLICAÇÕES NÃO SUPURATIVAS

2.4.1 Febre Reumática

Há diferenças na epidemiologia da febre reumática entre os países. Nos países desenvolvidos é endêmica e permanece como uma das maiores causas de doença cardiovascular, uma vez que 25 a 45% dos casos são devidos à febre reumática. É uma das maiores causas de mortalidade entre pessoas com menos de 50 anos de idade e, em muitas cidades do terceiro mundo, tem sido apontada como um grande problema relacionado à saúde pela Organização Mundial de Saúde. Nos países industrializados, a incidência anual de febre reumática é de 100 a 200 vezes maior que aquela observada em países desenvolvidos, onde os estreptococos do grupo A são identificados em mais de 25% das culturas de faringe feitas de isolados de crianças com faringite (OLIVIER, 2000; STOLLERMAN, 2001).

Fatores sócio-econômicos e ambiente não favorável (promiscuidade, aglomerações, ausência de recursos financeiros, falta de acesso a cuidados médicos e má nutrição) permanecem importantes nos países em desenvolvimento, favorecendo a transmissão do *S. pyogenes* e a ocorrência da febre reumática (OLIVIER, 2000).

O tratamento efetivo da faringotonsilite reduz o risco desta doença em cerca de 90%, mas os estreptococos do grupo A podem permanecer presentes na orofaringe até mesmo após tratamento adequado em cerca de 10% dos casos. Somente a faringite não tratada é capaz de induzir a febre reumática e todas as suas conseqüências. A doença manifesta-se com febre alta, dor nas articulações, artrite, cardite, coréia, eritema marginado e nódulos subcutâneos. A complicação

mais séria é a cardite, podendo levar à doença crônica e danos permanentes nas válvulas cardíacas (EFSTRATIOU, 2000; SCHWEON e NOVATNACK, 2003; OLIVIER, 2000).

Embora possa ocorrer em qualquer fase da vida, a febre reumática é mais freqüente em indivíduos entre cinco e 15 anos (crianças em idade escolar ou jovens adultos), duas a três semanas após infecção faríngea com estreptococos do grupo A. Esta faixa etária corresponde ao período de maior suscetibilidade às infecções do trato respiratório superior, que são mais freqüentes em comunidades pobres e rurais, do que em centros urbanos e indivíduos de classe média (PRESTES-CARNEIRO et al., 2005; SMOOT, et al., 2002).

Evidências sugerem que a proteína M está associada com a patogênese da febre reumática aguda, como uma consequência da resposta imune. Há produção de anticorpos dirigidos contra regiões repetidas da proteína M estreptocócica, ocorrendo reação cruzada com proteínas humanas, como a miosina cardíaca, e resposta inflamatória, levando à danos nas válvulas cardíacas. Tem sido sugerido que somente certos sorotipos M (referidos como de classe I) têm esse epítipo para reação cruzada. Sorotipos reumatogênicos de estreptococos do grupo A têm fatores de virulência que promovem uma resposta auto-imune em hospedeiros suscetíveis. Os tipos específicos que freqüentemente causam febre reumática (surto epidêmicos) são M1, M3, M5, M6, M18, M19 e M24 (OLIVEIRA, 1997; OLIVIER, 2000; SMOOT et al., 2002).

Para o diagnóstico clínico são utilizados os critérios modificados de Jones. Critérios maiores incluem cardite, eritema marginado, poliartrite, nódulos subcutâneos e coréia. Critérios menores incluem parâmetros clínicos (artralgia, febre) e laboratoriais (níveis elevados de proteína C reativa e de taxa de sedimentação dos eritrócitos, intervalo prolongado PR no eletrocardiograma). O diagnóstico de febre reumática é realizado pela evidência de infecção precedente por estreptococo do grupo A (cultura positiva de faringe ou teste rápido do antígeno estreptocócico, título elevado de anti-estreptolisina O) e a presença de duas manifestações maiores ou de uma maior e duas manifestações menores (HAHN et al., 2005).

O tratamento da febre reumática inclui anti-inflamatório e terapia antimicrobiana com penicilina G benzatina ou penicilina G procaína intra-muscular a cada 4 semanas. Eritromicina pode ser utilizada como alternativa (SCHWEON e NOVATNACK, 2003).

2.4.2 Glomerulonefrite

A glomerulonefrite ocorre cerca de três semanas após a infecção por estreptococo do grupo A de sorotipo nefritogênico. A doença afeta cerca de 15% dos indivíduos infectados, embora muitos casos sejam subclínicos e se resolvam. É uma rara complicação da infecção estreptocócica, que pode seguir-se a faringites (comumente no inverno) ou infecções cutâneas (comumente no verão), causadas principalmente pelo sorotipo M12. Epidemias de impetigo causadas por sorotipos nefritogênicos resultam na alta incidência de glomerulonefrite em crianças, cuja frequência é maior entre os meninos (EFSTRATIOU, 2000; SCHWEON e NOVATNACK, 2003; STEVENS, 2004; VINEN e OLIVEIRA, 2003).

Na glomerulonefrite pós-estreptocócica, anticorpos são formados contra um antígeno estreptocócico implantado no glomérulo durante a infecção. Ocorre alteração da permeabilidade da membrana glomerular, permitindo a deposição dos complexos imunes pré-formados. O antígeno estreptocócico pode estabelecer reação cruzada com estruturas glomerulares ou diretamente ativar o complemento com subsequente atração de células inflamatórias. Neutrófilos são atraídos ao glomérulo por produtos da ativação do complemento. Os depósitos imunes iniciam a glomerulonefrite difusa proliferativa, afetando as células mesangiais e endoteliais (COUSER, 1999; OLIVEIRA, 1997; VINEN e OLIVEIRA, 2003).

A maioria dos pacientes apresenta a síndrome nefrítica aguda incluindo hematúria com urina escura, proteinúria, sedimento urinário, retenção líquida, edema, hipertensão com redução da função renal, dor de cabeça, anorexia, náusea e vômito. A sorologia mostra aumento dos títulos de anticorpos anti-estreptolisina, mas sua ausência não exclui o diagnóstico, pois alguns sorotipos nefritogênicos não produzem estreptolisina (COUSER, 1999; HAHN et al., 2005; SCHWEON e NOVATNACK, 2003; VINEN e OLIVEIRA, 2003).

Não existe terapia específica para a glomerulonefrite pós-estreptocócica. Na ausência de falência renal aguda somente a terapia de suporte com agentes anti-hipertensivos e diuréticos para o controle da pressão sanguínea e da retenção de líquidos é necessária. Cerca de 95% dos pacientes se recuperam espontaneamente com retorno da função renal normal dentro de três a quatro semanas e sem seqüelas. Quando há atraso na resolução da doença, falência

renal severa e progressiva, dor nas articulações, hepatoesplenomegalia e febre persistente podem ocorrer, então a biópsia é indicada para assegurar que não existe uma causa mais séria para a doença. Casos isolados de encefalopatia hipertensiva têm sido causados por glomerulonefrite assintomática, indicando o largo espectro da doença pós-estreptocócica (HAHN et al., 2005).

2.5 UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE SOROTIPOS DE *S. pyogenes*

Surtos de doenças infecciosas freqüentemente resultam de exposição a uma fonte comum do agente etiológico, que geralmente é derivado de uma única célula, cuja progênie é geneticamente idêntica ou proximamente relacionada ao organismo de origem. Em termos epidemiológicos, os microrganismos envolvidos no surto são clonalmente relacionados; são membros da mesma espécie que compartilham fatores de virulência, características bioquímicas e características genéticas. Entretanto, existe diversidade no nível de espécie, e microrganismos isolados de diferentes fontes, em diferentes tempos e diferentes regiões geográficas, podem ser diferenciados ou classificados dentro de sorotipos (OLIVE e BEAN, 1999).

Os sistemas de tipagem sorológica baseados na superfície exposta da proteína M permitem estabelecer relação entre os sorotipos de estreptococos do grupo A com as doenças que eles causam. A maioria dos estudos sobre a epidemiologia das infecções tem se baseado no reconhecimento de sorotipos específicos da proteína M e no fator de opacidade do soro. O reconhecimento do antígeno T também tem sido útil, embora os antígenos T não sejam específicos. A sorotipagem por antígenos M e/ou T pode distinguir entre recorrências causadas por uma nova linhagem de *S. pyogenes* e a persistência de uma linhagem original, porém, muitas linhagens não podem ser tipadas devido à falta de anti-soro tipo-específico apropriado. A sorotipagem destes antígenos pode ser insuficiente para diferenciação clonal em estudos epidemiológicos, ao passo que técnicas moleculares podem identificar linhagens dentro de um mesmo sorotipo sendo, portanto, indispensáveis para a elucidação de surtos (BERT et al., 1997; GONZÁLEZ-REY et al., 2003; GRUTEKE et al., 1996; OSTERLUND e

ENGSTRAND, 1995; SEPPALA et al., 1994; SINGLE e MARTIN, 1992; TENOVER et al., 1995; TYRRELL et al., 2002; YAN et al., 2003).

A tipagem molecular é capaz de detectar a fonte de infecção e auxiliar na diferenciação de sorotipos não relacionados, reumatogênicos ou nefritogênicos, e fornece evidência laboratorial de que isolados epidemiologicamente relacionados coletados durante um surto ou doença também são relacionados geneticamente e então representam o mesmo sorotipo (OLIVE e BEAN, 1999, TENOVER et al., 1995).

Em anos recentes, vários estudos epidemiológicos envolvendo *S. pyogenes* têm utilizado métodos moleculares, como *Restriction Endonuclease Analysis* (REA), *Ribotyping*, tipagem do gene *emm*, PFGE (*Pulsed-field gel electrophoresis*) e RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*). Estas técnicas têm mostrado uma boa capacidade de diferenciação entre vários clones de estreptococos do grupo A porém, a maioria destes métodos requer muito tempo, e são caros, além de tecnicamente exigentes (BERT et al., 1997; GONZÁLEZ-REY et al., 2003; OSTERLUND e ENGSTRAND, 1995; YAN et al., 2003).

Muitas técnicas moleculares usadas para tipagem baseiam-se na separação eletroforética de fragmentos de DNA de diferentes comprimentos moleculares. O resultado é representado por um padrão de bandas em um gel. A facilidade com a qual os padrões são interpretados e relacionados é um fator que deve ser levado em conta na escolha de um método de tipagem, bem como sua praticidade, facilidade técnica, custo e tempo (OLIVE e BEAN, 1999).

O seqüenciamento do gene *emm*, que codifica a proteína M, é utilizado para a caracterização de sorotipos de estreptococos do grupo A. Uma vez que as seqüências *emm* 5' podem ser eficiente e confiavelmente utilizadas para identificar sorotipos M, este sistema de tipagem é uma ferramenta molecular epidemiológica com a qual se pode investigar e monitorar a diversidade dos isolados. Esta análise tem sido bastante utilizada na resolução de surtos e em estudos epidemiológicos, muitas vezes com outro tipo de marcador molecular, como PFGE, *Ribotyping* e *Multilocus sequence typing* (MLST) (DOKTOR et al., 2005; TYRRELL et al., 2002 YAN et al., 2003).

MLST utiliza seqüências internas de loci *housekeeping*, que são comparadas para caracterizar os isolados, enquanto *ribotyping*, ou tipagem do DNA ribossomal, é uma variação de *RFLP-Southern blotting*, na qual as probes

são derivadas de genes do rRNA 16S e 23S (DOKTOR et al., 2005; OLIVE e BEAN, 1999).

A eletroforese em campo pulsado, ou PFGE, envolve a lise bacteriana *in situ* e utiliza enzimas de restrição para clivar o DNA. Os fragmentos de DNA cromossomal são submetidos à eletroforese, na qual a direção da corrente elétrica é mudada em intervalos pré-determinados e os padrões dos fragmentos de DNA resultantes são comparados. PFGE também é amplamente utilizado nas investigações epidemiológicas envolvendo *S. pyogenes* e seus resultados mostram correlação com os tradicionais métodos de sorotipagem da proteína M e T, além de distinguir os isolados pertencentes ao mesmo tipo M (OLIVE e BEAN, 1999; TENOVER et al., 1995; SINGLE e MARTIN, 1992; STEP et al., 1999).

RAPD, também chamado *Arbitrary Primed PCR* (AP-PCR), é mais fácil, rápido e menos oneroso que outros métodos de tipagem molecular e tem sido utilizado na resolução de assuntos epidemiológicos envolvendo estreptococos do grupo A. O método recebe atenção por sua simplicidade, rapidez e por requerer mínimas quantidades de DNA genômico. A estratégia básica envolve a amplificação de fragmentos ao acaso do DNA genômico, com um único *primer* de sequência arbitrária. A ligação do *primer* ao DNA é favorecida pela baixa temperatura de anelamento. Os múltiplos produtos de PCR são separados de acordo com o tamanho por eletroforese em gel de agarose. Os padrões de RAPD resultantes de diferentes isolados podem então ser comparados. Polimorfismos entre sorotipos são detectados como diferenças entre os padrões de fragmentos de DNA amplificados. RAPD é uma ferramenta que possibilita a diferenciação entre sorotipos (GONZÁLEZ-REY et al., 2003; MICHELI et al., 1994; SCOTT et al., 1992; SEPPALA et al., 1994).

O uso de um único *primer* no RAPD permite reconhecimento apropriado de um amplo número de sorotipos de estreptococos do grupo A, mas a eficiência do RAPD pode ser aumentada pelo uso paralelo de vários *primers*. A otimização das condições da PCR é de grande importância para a maximização do poder discriminatório do RAPD. Os padrões de RAPD produzidos são altamente dependentes das condições específicas da reação e da concentração dos reagentes. Variações na temperatura de anelamento, a proporção da concentração *primer*-DNA e a concentração de magnésio afetam os resultados. As sensibilidades dos diferentes *primers* à variações nestes parâmetros pode ser

diferente. Até mesmo o uso de um termociclador diferente pode causar variação (BERT et al, 1997; GRUTEKE et al., 1996; OLIVE e BEAN, 1999; SEPPALA et al., 1994).

O trabalho de GRUTEKE et al, 1996, investigou um surto de estreptococos do grupo A em um centro de queimados, envolvendo pacientes e funcionários. Isolados dos pacientes e dos funcionários foram identificados e submetidos à sorotipagem da proteína T, genotipagem da proteína M e RAPD. Os dados mostraram que surto foi causado por dois sorotipos de estreptococos do grupo A, identificados como T4/28-M48 e T13-M77, pela sorotipagem e genotipagem. RAPD distinguiu ambos os sorotipos, com a utilização dos *primers* ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences*) baseados em seqüências consenso intergênicas repetitivas de enterobactérias.

O objetivo do trabalho de OSTERLUND e ENGSTRAND, 1995, foi utilizar RAPD para comparação entre pré e pós-tratamento de infecções por *S. pyogenes*. O estudo utilizou isolados de pacientes com faringotonsilite. Os isolados coletados pré e pós-tratamentos (duas a quatro semanas após uso de antibiótico) mostraram padrões de RAPD idênticos, indicando que as recorrências nesses pacientes foram causadas por linhagens homólogas de *S. pyogenes*. Foi possível diferenciar entre diferentes sorotipos T e entre clones do mesmo sorotipo de *S. pyogenes*.

SEPPALA et al., 1994, realizaram, por meio de marcadores RAPD, a análise de 160 isolados de estreptococos do grupo A, epidemiologicamente não relacionados, comparando os dados obtidos por RAPD com REA e sorotipagem das proteínas T e M. A amplificação do DNA genômico foi realizada com um único *primer* de seqüência arbitrariamente selecionada. No total, 31 padrões de RAPD e 15 padrões de REA foram observados entre os isolados estudados. Os resultados da análise por RAPD foram compatíveis com os resultados de REA para 86% dos isolados, e ambos os métodos identificaram 15 diferentes sorotipos entre 138 isolados. Entretanto, RAPD diferenciou 16 sorotipos adicionais entre 22 isolados. A análise por RAPD foi mais eficiente do que REA para diferenciação dos isolados do mesmo sorotipo e de sorotipos diferentes. Isto se deve o fato de que pequenas modificações na seqüência de DNA, como mutações, deleções ou inserções não envolvendo sítios de restrição, podem não ser detectadas por REA, mas podem produzir um novo padrão de RAPD pela criação ou destruição de um

sítio alvo para o *primer*. Embora a análise por RAPD tenha sido mais eficiente que REA na diferenciação entre isolados com diferentes sorotipos, RAPD não diferenciou todos os sorotipos utilizados no estudo, e para isto recomenda-se que seja usado em paralelo com sorotipagem da proteína M.

RAPD pode ser utilizado em conjunto com PFGE, em estudos epidemiológicos de infecções por estreptococos do grupo A. GONZÁLEZ-REY et al., 2003, investigaram um surto de estreptococos do grupo A em duas alas diferentes de uma maternidade. Dez isolados coletados de pacientes e funcionários da maternidade mostraram o mesmo padrão no RAPD, porém, um dos isolados mostrou um padrão fracamente diferente quando PFGE foi realizado. Este diferente padrão encontrado não significou um clone distinto, sugerindo que houve uma fonte comum de contaminação durante o surto. Tanto RAPD quanto PFGE foram capazes de discriminar entre diferentes sorotipos T.

A utilização de RAPD em conjunto com PFGE adiciona informações importantes aos sistemas tradicionais de sorotipagem das proteínas M e T, uma vez que identificam linhagens dentro de um mesmo sorotipo (BERT et al, 1997; GONZÁLEZ-REY et al., 2003). PFGE e RAPD mostram uma grande correlação na diferenciação de sorotipos, entretanto, o polimorfismo observado entre os sorotipos de estreptococos do grupo A no trabalho de BERT et al. (2003), foi maior quando se utilizou PFGE.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

As 26 amostras analisadas foram obtidas de um surto de faringite estreptocócica, ocorrido em março de 2004 em uma indústria de gêneros alimentícios na cidade de Curitiba, PR e identificadas pelo LACEN (Laboratório Central do Estado). Foram também analisados 11 isolados de *Streptococcus pyogenes* não relacionados com o surto, coletados de indivíduos procedentes de diferentes áreas da cidade de Curitiba, no mesmo período do surto, para serem utilizados como grupo externo, e duas linhagens referências ATCC de sorotipo nefritogênico, fornecidos pelo LACEN. Também foi utilizada uma linhagem referência reumatogênica obtida da coleção ATCC (*American Type Culture Collection*) (Tabela 1).

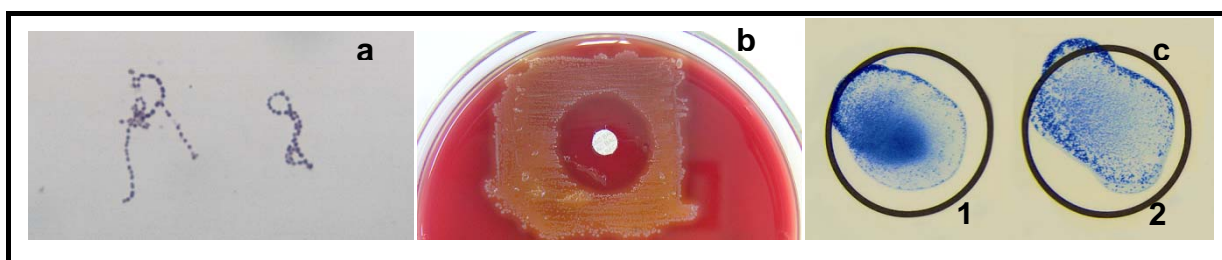
TABELA 1 - LINHAGENS DE *Streptococcus pyogenes* UTILIZADAS NO ESTUDO

Nomenclatura das linhagens	Procedência
S	Isolados do suposto surto de faringite estreptocócica (1ª coleta)
S'	Isolados do suposto surto de faringite estreptocócica (2ª coleta)
NS	Isolados de <i>S. pyogenes</i> não relacionados com o suposto surto, utilizados como grupo externo
M4	Linhagem referência ATCC12385 – sorotipo nefritogênico
M49	Linhagem referência ATCC13540 – sorotipo nefritogênico
M18	Linhagem referência ATCC-BAA572 – sorotipo reumatogênico

Fonte: LACEN (linhagens S, S', NS, ATCC 12385 e ATCC 13540) e ATCC (linhagem BAA572)

Os isolados fornecidos pelo LACEN foram confirmados através de caracterização morfológica, sensibilidade à bacitracina e prova sorológica do grupo A em látex, conforme Figura 1.

FIGURA 1 - PROVAS UTILIZADAS NA CONFIRMAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS



a: caracterização morfológica através da coloração de Gram, mostrando cocos Gram positivos em cadeias; b: teste de sensibilidade à bacitracina, demonstrando que os isolados foram sensíveis; c: prova sorológica do grupo A positiva, onde (1) é o controle positivo e (2) é o isolado

De acordo com a prova sorológica realizada, apenas um isolado não apresentou aglutinação em látex, sendo descartado da análise genética. Desta forma, o estudo foi realizado com 26 isolados do surto.

3.2 MEIOS DE CULTURA E REAGENTES QUÍMICOS: ANEXOS I E II

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com VICENTE (2000) modificado. As amostras foram previamente inoculadas em caldo BHI e incubadas por 24h a 36°C. Após este período as culturas foram centrifugadas a 49000 x g por 2 min e o sedimento transferido a um tubo contendo uma mistura de sílica em pó (sílica gel Merck) e celite 2:1 em 600µl do detergente tamponado CTAB. Em seguida foram aplicados 3 pulsos (de 30 seg) de ultrassom (potência 70), com intervalos de 30 seg entre cada pulso, sob banho de gelo, utilizando disruptor de célula ultrassônico (marca Unique). Após este tratamento, foram adicionados mais 400 µl de CTAB e as amostras incubadas em banho-maria a 65°C por 10 min. Após atingir temperatura ambiente, foram adicionados 1000 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (CIA) e os tubos centrifugados a 49000 x g por 7 min. O sobrenadante foi transferido a outro tubo, ao qual foram adicionados mais 1000 µl de CIA e a centrifugação repetida. Cerca de 2000 µl de álcool 96% gelado foram adicionados ao sobrenadante e os tubos foram incubados a -20°C por 30 min para precipitação dos ácidos nucleicos. Após este período, foram centrifugados a 49000 x g por 7 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com álcool 70% gelado

e repetida a centrifugação a 49000 x g por 7 min. O álcool foi retirado e os tubos vertidos em fluxo laminar até a secagem completa do precipitado. Posteriormente foram adicionados 50µl de água ultrapura para ressuspender o DNA. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 24h e armazenados a -4°C.

Após a quantificação do DNA em espectrofotometria (260nm), a integridade foi verificada mediante eletroforese em gel de agarose 0,8%, e visualizada com brometo de etídio em UV.

3.4 VARIABILIDADE GENÉTICA – RAPD

3.4.1 Amplificação do DNA por RAPD

Para a amplificação do DNA, foram utilizadas as condições descritas por PEREIRA et al., 2002, modificado, utilizando uma mistura contendo, além da amostra de DNA, os seguintes elementos: 1,5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 0,4 mM para cada dNTP, 4,0 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 0,4 mM de *primer*, 10 mM de tampão da enzima 1X e 12 ng de DNA por 15 µl de reação.

As condições de amplificação foram realizadas de acordo com SPOLIDORIO et al., 2003, modificado: foram utilizados 40 ciclos com as seguintes condições: 30s a 94°C; 30s a 36°C e 1 min a 72°C. Foram utilizados 5 min a 94°C para desnaturação inicial e 3 min a 72°C de extensão final.

Os oligonucleotídeos utilizados foram da linha Operon e suas respectivas seqüências podem ser visualizadas na Tabela 2.

TABELA 2 - SEQUÊNCIAS DOS *PRIMERS* UTILIZADOS NO RAPD

PRIMER	SEQUÊNCIA
OPA 1	5'CAGGCCCTTC3'
OPA 2	5'TGCCGAGCTG3'
OPA 9	5'GGGTAACGCC3'
OPA 13	5'CAGCACCCAC3'

Fonte: Operon Technologies®

Após a amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,4% (105 V). O marcador molecular utilizado foi DNA *ladder* de 100 pb. O gel foi corado em brometo de etídio e fotografado sob luz UV.

3.4.2 Análise do Polimorfismo Obtido por RAPD

Para a análise da variabilidade genética foi utilizado o *software* NTSYSpc 2.1 (*Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs*) (ROHLF, 1988).

Para o padrão de bandas resultantes foi construída uma matriz binária, sendo atribuído valor zero para ausência de banda e valor 1 para presença. Com base na matriz binária foi construída uma matriz de similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard (J), que permite calcular similaridades a partir de variáveis binárias. As bandas foram consideradas como variáveis e as linhagens como unidades.

Os métodos hierárquicos UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) e WPGMA (*Weighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) foram utilizados para agrupar as unidades e construir os dendrogramas. O *software* Bood 3.03 (COELHO, 2005) foi utilizado para a análise *bootstrap*, que verifica a confiabilidade dos agrupamentos dos dendrogramas gerados, utilizando-se 10.000 reamostragens. Foram considerados consistentes os agrupamentos com valor de *bootstrap* acima de 50%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em março de 2004, funcionários de uma indústria de gêneros alimentícios, na cidade de Curitiba-PR, apresentaram sintomas semelhantes, no mesmo período, caracterizando um suposto surto de faringite estreptocócica. Após a coleta da secreção de orofaringe, os isolados de *S. pyogenes* foram caracterizados morfolologicamente, utilizando coloração de Gram e prova sorológica, pelo LACEN.

Amostras de 98 funcionários (incluindo os sintomáticos e assintomáticos), foram coletadas, recuperando-se 27 isolados identificados como estreptococos β -hemolíticos do grupo A (*S. pyogenes*), envolvendo duas coletas. Porém, um dos isolados foi descartado por não pertencer ao grupo A de Lancefield, segundo a prova sorológica em látex. Os isolados estão sumarizados na Tabela 3.

TABELA 3 - ISOLADOS DE *S. pyogenes* PROVENIENTES DE PACIENTES RELACIONADOS AO SUPOSTO SURTO

ISOLADOS (1ª COLETA)	TRATAMENTO*	ISOLADOS (2ª COLETA)
S1	SIM	S1'
S2	SIM	-
S3	SIM	-
S4	SIM	-
S5	NÃO	S5'
S6	SIM	-
S7	SIM	S7'
S8	NÃO	S8'
S9	SIM	-
S10	SIM	-
S11	SIM	-
S12	SIM	-
S13	NÃO	S13'
S14	NÃO	S14'
S15	SIM	-
S16	SIM	S16'
S17	NÃO	S17'
S18	SIM	-

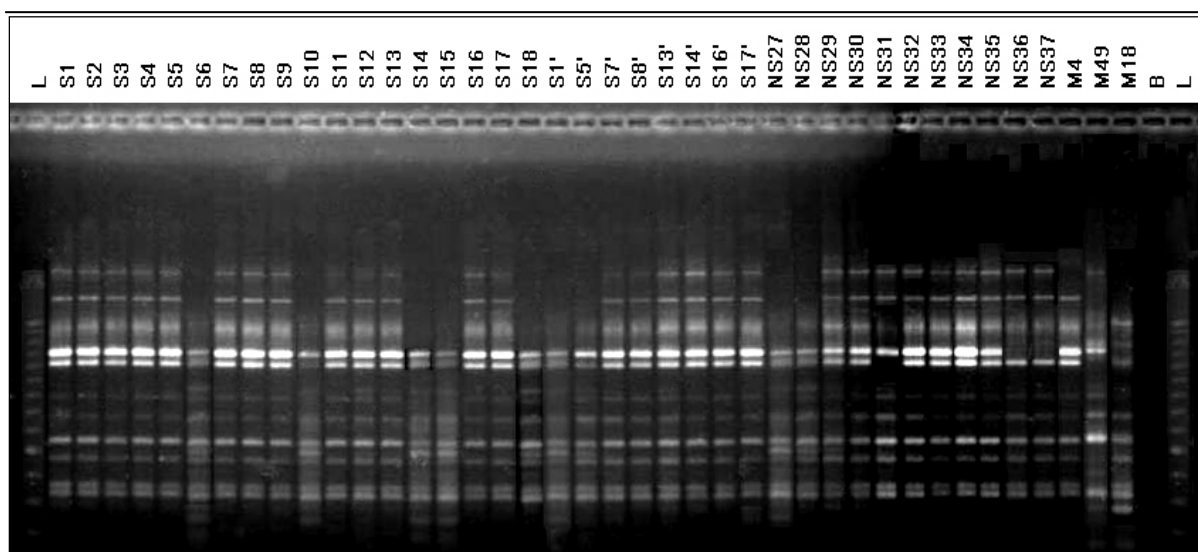
* penicilina G benzatina intramuscular

S: isolado proveniente do surto; (-) coleta não realizada

O isolado S9 (Tabela 3) foi obtido a partir do primeiro paciente a apresentar sintomas de faringite estreptocócica, com evolução para glomerulonefrite. Dentro deste contexto, na investigação molecular do surto, por meio de marcadores RAPD, utilizou-se as linhagens referências M4 e M49, de natureza nefritogênica.

Para análise da variabilidade genética dos isolados do suposto surto, foram utilizados os isolados apresentados na Tabela 3, isolados de *S. pyogenes* provenientes de indivíduos de diferentes áreas da cidade utilizados como grupo externo e as linhagens referências M4, M49 e M18 (Tabela 1 da metodologia). Com a utilização de 4 *primers* descritos na Tabela 2 da metodologia, foram geradas 32 bandas. O perfil de amplificação com o *primer* OPA 9 pode ser visualizado na Figura 2.

FIGURA 2 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *S. pyogenes* UTILIZANDO O *PRIMER* OPA 9



Eletroforese em gel de agarose 1,4% das linhagens descritas na tabela 3; L: *Ladder* (marcador molecular de 100 pb); B: branco (controle negativo da reação)

Os isolados envolvidos no surto foram separados em dois grupos (grupos I e II), indicando que o surto foi provocado por dois sorotipos diferentes (Figura 3). O grupo I foi formado por 19 isolados do surto (S1, S2, S3, S4, S5, S7, S8, S9, S11, S12, S13, S16, S17, S19, S21, S22, S23, S24, S25) e seis não relacionados (NS29, NS30, NS32, NS33, NS34, NS35), com 100% de similaridade genética entre si. O grupo II reuniu sete isolados do surto (S6, S10, S14, S15, S18, S1',

S5') e dois isolados não relacionados (NS27, NS28), com 100% de similaridade genética entre si. O grupo I apresentou 95% de similaridade genética com a linhagem referência nefritogênica M4 (ATCC 12385). Esta similaridade, aliada ao fato de um isolado (S9) deste grupo ser proveniente de um paciente que apresentou glomerulonefrite, sugere a natureza nefritogênica destes isolados.

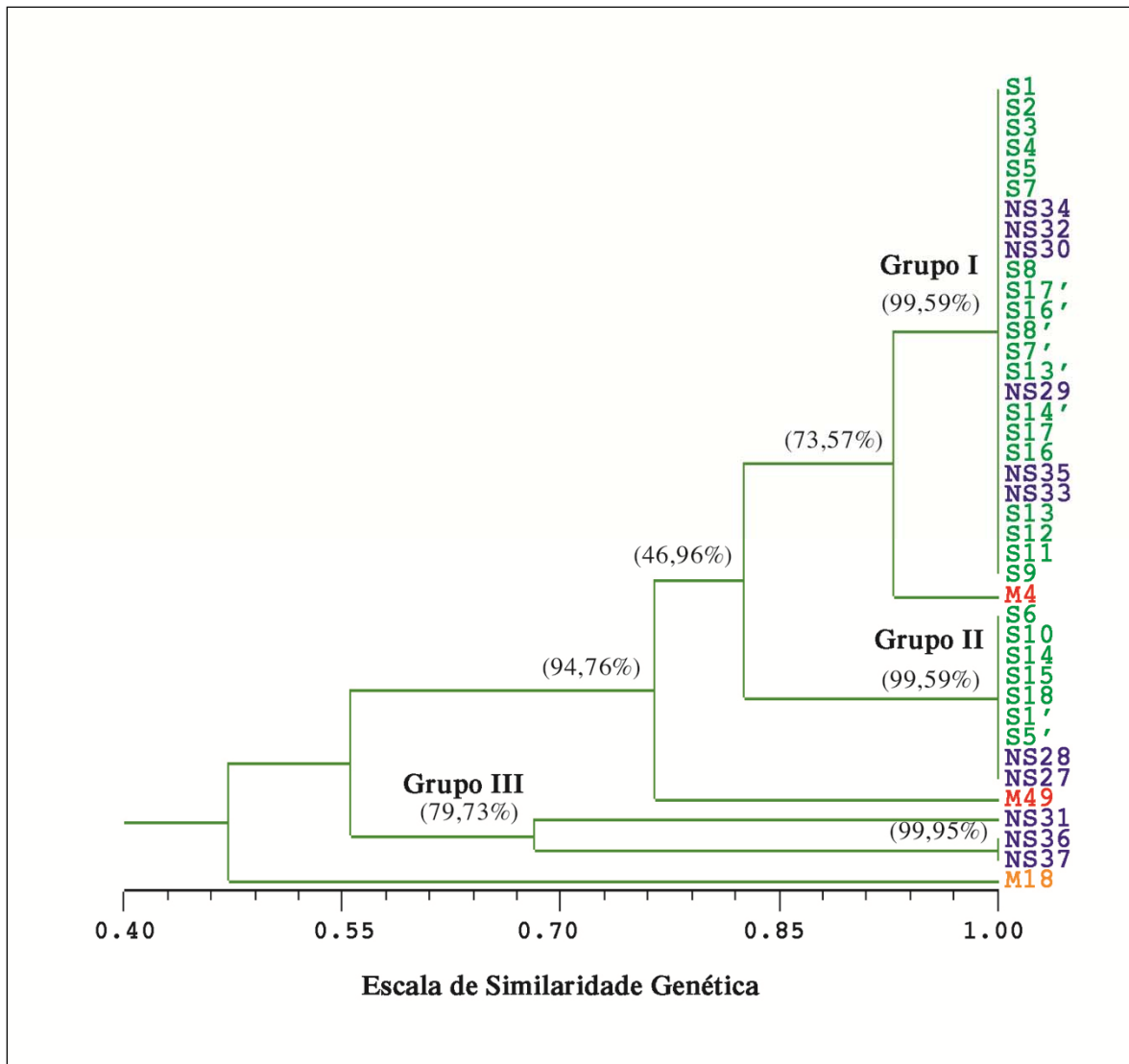
Alguns isolados não relacionados ao surto foram distribuídos dentro dos grupos I e II (seis no grupo I e dois no grupo II), e três formaram um terceiro grupo (NS31, NS36 e NS37, grupo III) (Figura 3), apresentando variabilidade genética entre si e com os demais grupos, indicando a origem diferente destes.

Os valores de *bootstrap* do agrupamento formado pelos grupos I e II não apresentaram consistência (Figura 3). A partir disto, foram realizadas outras análises de agrupamento. A primeira utilizou o método de agrupamento WPGMA (Figura 4) e a segunda uma análise de componentes principais (Figura 5).

O dendrograma encontrado por WPGMA (Figura 4), mostrou-se em conformidade com a análise de componentes principais (Figura 5), diferentemente do dendrograma da Figura 3. Tal fato demonstra que os baixos valores de *bootstrap*, provavelmente, estavam relacionados à linhagem M49, que ficou agrupada de maneiras diferentes nos dendrogramas (Figuras 3 e 4).

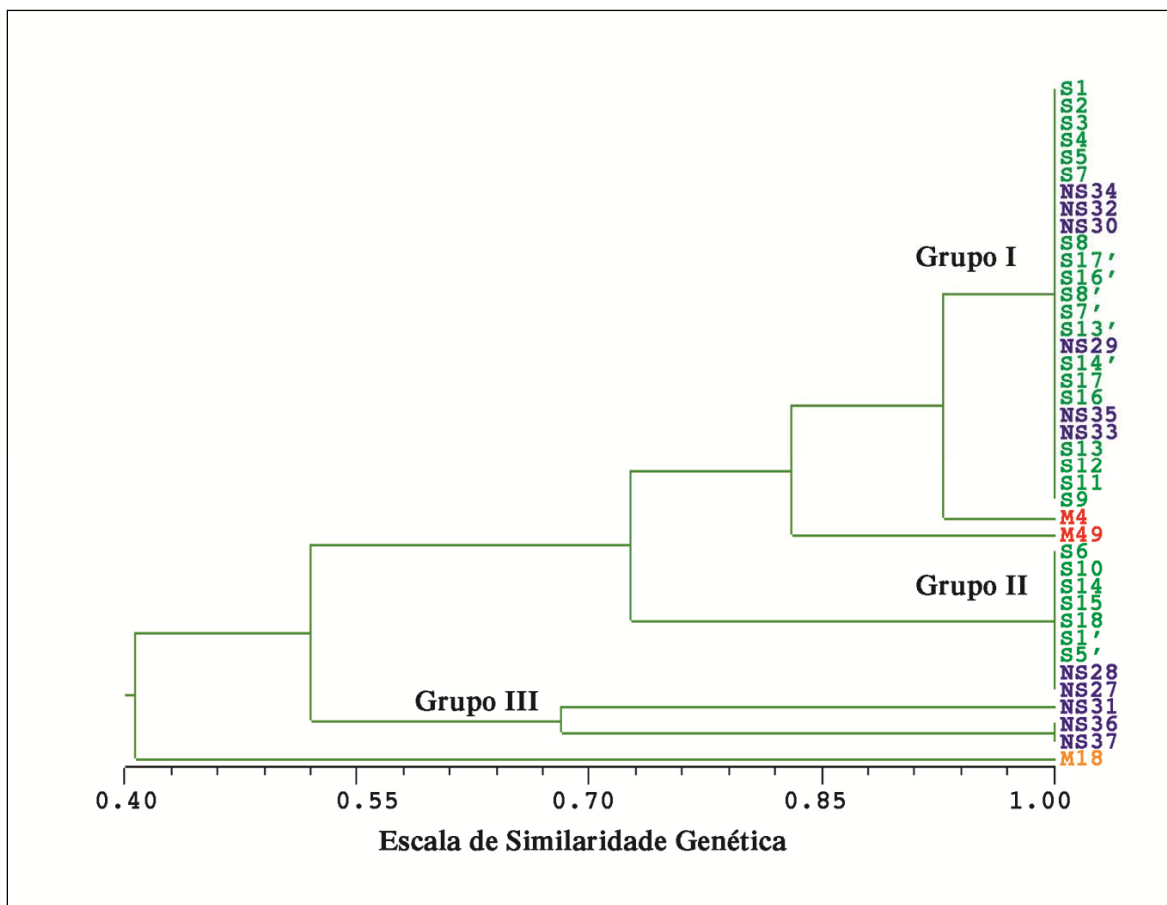
Para melhor visualização dos grupos observados nos dendrogramas das Figuras 3 e 4, foi realizada a análise de componentes principais, apresentada na Figura 5, onde pode-se observar mais claramente a separação dos grupos gerados pelo dendrograma da Figura 4, uma vez que a visualização é tridimensional. Esta análise refletiu melhor a divisão dos grupos I, II e III (Figura 5). Além disto, foi observado que as linhagens M4, M49 e o grupo I são mais semelhantes entre si quando comparados com o grupo II e com a linhagem referência reumatogênica M18.

FIGURA 3 - DENDROGRAMA GERADO A PARTIR DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE OS GRUPOS DE *S. pyogenes* UTILIZANDO O MÉTODO DE AGRUPAMENTO UPGMA



Dendrograma gerado a partir de similaridade genética obtida por marcadores RAPD das linhagens descritas na Tabela 3, utilizando-se o coeficiente de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA. As linhagens pertencentes ao surto estão sinalizadas pela letra (S), em verde; linhagens não relacionadas ao surto pelas letras (NS), em azul; linhagens referências nefritogênicas (M4 e M49) em vermelho e linhagem referência reumatogênica (M18), em amarelo. Os valores de *bootstrap* (%) estão representados entre parênteses.

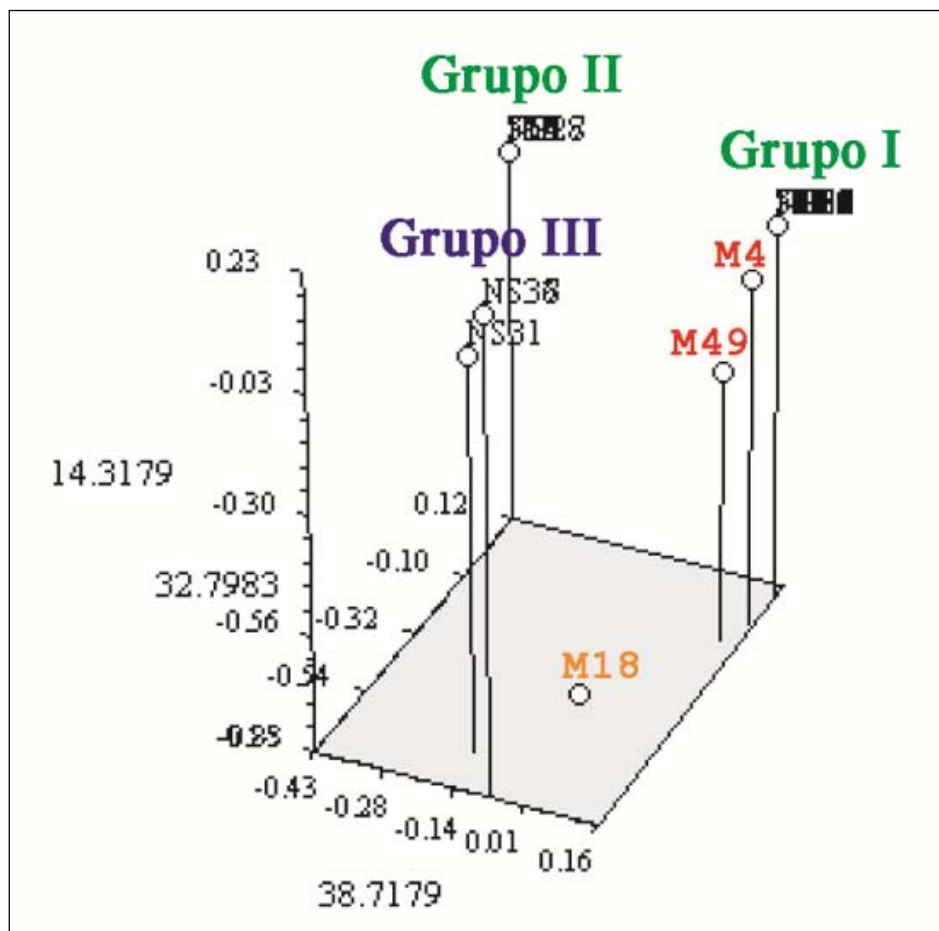
FIGURA 4 -DENDROGRAMA GERADO A PARTIR DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE OS GRUPOS DE *S. pyogenes* UTILIZANDO O MÉTODO DE AGRUPAMENTO WPGMA



Dendrograma gerado a partir de similaridade genética obtida por marcadores RAPD das linhagens descritas na Tabela 3, utilizando-se o coeficiente de Jaccard e o método de agrupamento WPGMA. Linhagens pertencentes ao surto estão sinalizadas pela letra (S), em verde; linhagens não relacionadas ao surto pelas letras (NS), em azul; M4 e M49: linhagens referências nefritogênicas, em vermelho; M18: linhagem referência reumatogênica, em amarelo.

A linhagem referência reumatogênica M18 apresentou cerca de 50% de similaridade genética com os demais agrupamentos. A análise de componentes principais (Figura 5) sugere que os isolados do grupo III (NS31, NS36 e NS37) podem ser de sorotipo reumatogênico, fato que poderá ser comprovado pela sorotipagem da proteína M.

FIGURA 5 - GRÁFICO TRIDIMENSIONAL REPRESENTANDO A ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS ENTRE OS ISOLADOS DE *S. pyogenes*



Grupo I e II, sinalizados em verde: isolados do surto e não relacionados ao surto; grupo III, sinalizado em azul: isolados não relacionados ao surto; M4 e M49: linhagens referências nefritogênicas, em vermelho; M18: linhagem referência reumatogênica, em amarelo.

Foi observada maior variabilidade genética entre os isolados não relacionados ao surto, que foram coletados de indivíduos procedentes de diferentes áreas, no mesmo período de ocorrência do surto. A inclusão destes

isolados nos grupos I e II indica que houve circulação destes na região de Curitiba, pelo menos na época do surto.

Isto é justificável, pois este microrganismo é facilmente transmitido através do ar e pode causar surtos, uma vez que o risco de contágio é maior em aglomerações e quando o indivíduo é sintomático (KAPLAN e SHET, 2004; OLIVIER, 2000; SCHWEON e NOVATNACK, 2003). Sendo assim, é possível a existência, circulação e transmissão de mais de um sorotipo dentro de uma mesma região.

Resultados semelhantes foram observados por KAPLAN et al. (2001), verificando a circulação de mais de um sorotipo de *S. pyogenes* dentro da mesma população. Indivíduos diagnosticados com infecção pelo sorotipo M1 subseqüentemente adquiriram o sorotipo M6, demonstrando a possibilidade da circulação de mais de um sorotipo num mesmo local. GRUTEKE et al. (1996) confirmaram esta possibilidade utilizando RAPD, sorotipagem da proteína T e genotipagem da proteína M na investigação de um surto de estreptococos do grupo A, onde foram encontrados dois sorotipos diferentes.

SANS et al. em 2005, relataram infecção por dois sorotipos diferentes num mesmo indivíduo com escarlatina recorrente, causada por *S. pyogenes*, após tratamento com penicilina e evolução satisfatória das manifestações clínicas. Seqüenciamento do gene *emm-T* e aglutinação com sorotipos T específicos foram utilizados na identificação dos dois sorotipos, *emm3-TNT* e *emm1-T1*. Além disso, por meio de eletroforese em campo pulsado (PFGE) verificou-se ausência de relação entre os isolados, o que comprovou a circulação e transmissão de mais de um sorotipo.

Neste estudo foram utilizados isolados (S1', S5', S7', S8', S13', S14', S16' e S17') provenientes da segunda coleta em oito pacientes com sintomas persistentes da faringite após prescrição do tratamento. Parte dos isolados se mantiveram no mesmo grupo daqueles obtidos na primeira coleta, enquanto outros foram distribuídos em grupos diferentes (Tabela 4).

TABELA 4 - AGRUPAMENTO DOS ISOLADOS DA PRIMEIRA E SEGUNDA COLETA DE ACORDO COM O DENDROGRAMA DA FIGURA 3

ISOLADOS (1ª coleta)*	GRUPO	TRATAMENTO	ISOLADOS (2ª coleta)**	GRUPO
S1	I	07/04/04	S1'	II
S5	I	Não aderiu	S5'	II
S7	I	07/04/04	S7'	I
S8	I	Não aderiu	S8'	I
S13	I	Não aderiu	S13'	I
S14	II	Não aderiu	S14'	I
S16	I	12/04/04	S16'	I
S17	I	Não aderiu	S17'	I

Fonte dos dados: LACEN

Coletas realizadas em *05/04/04 e **26/04/04 respectivamente

Os indivíduos cujos isolados na primeira coleta foram S5 e S7 (grupo I, Figura 2), haviam feito uso dos antibióticos penicilina G benzatina e amoxicilina, respectivamente, antes da primeira coleta ser realizada. O segundo isolado (S5') ficou agrupado de forma diferente ao primeiro (S5) no dendrograma (grupo II, Tabela 4), sugerindo que o primeiro isolado foi eliminado através do uso da penicilina e o segundo, outro sorotipo circulante, foi decorrente de infecção posterior. Ou, ainda, a penicilina pode ter eliminado um dos sorotipos (S5, grupo I) e o outro não; este último (S5', grupo II) sendo recuperado na segunda coleta.

Os isolados S7 e 7' foram agrupados no grupo I (Tabela 4), sugerindo que o uso da amoxicilina antes e da penicilina após a primeira coleta não eliminaram os isolados. Uma situação semelhante foi encontrada para os isolados S16 e 16' (grupo I, Tabela 4).

KAPLAN e JOHNSON, 2001, visando detectar falhas na terapia antimicrobiana para *S. pyogenes*, encontraram que a penicilina não foi efetiva em tratar infecções causadas por vários sorotipos diferentes, entre eles o sorotipo nefritogênico M4, que é o mesmo sorotipo de uma das linhagens referências utilizadas neste trabalho, e provavelmente o dos isolados do grupo I.

Os isolados S8', S13' e S17', obtidos de pacientes que não aderiram ao tratamento, foram reunidos no grupo I (Tabela 4), indicando que a infecção nestes indivíduos estava sendo causada por um único sorotipo.

No entanto, ainda para os indivíduos que não aderiram tratamento, verificou-se isolados de coletas diferentes (S14 e 14') agrupados separadamente (Tabela 4). Isto sugere que a primeira infecção foi resolvida espontaneamente, uma vez que a faringite estreptocócica pode ser auto-limitada (KAPLAN e SHET, 2004), e a posterior foi causada por outro sorotipo.

O terceiro grupo de pacientes, caracterizado por indivíduos que aderiram ao tratamento com penicilina, apresentou isolados (S1 e 1') que se agruparam separadamente (grupos I e II, Tabela 4) o que parece sugerir que foram eliminados pela penicilina e os pacientes adquiriram infecção posterior por outro sorotipo.

Embora exista sensibilidade *in vitro* para os isolados de *S. pyogenes* ao antibiótico penicilina, falhas terapêuticas podem ocorrer entre 25 e 35%. Isto pode ser devido à capacidade do microrganismo permanecer protegido da ação do agente antimicrobiano, à falta de adesão ao tratamento ou re-infecção (CONLEY, et al., 2003; COSTA, et al., 2003; GERBER et al., 1999; MELO et al., 2003; SANS et al., 2005; SCALABRIN, et al., 2003; STEININGER et al., 2002).

FAY et al., 1999 estudaram surtos de glomerulonefrite aguda pós-estreptocócica, onde, apesar de terem observado um declínio no número semanal de novos casos após a intervenção com penicilina G benzatina, alguns casos continuaram a ocorrer nas semanas seguintes. Isto pode estar relacionado com a disseminação intrafamiliar, fazendo com que a transmissão continue a ocorrer.

A variação na capacidade de aderência de um determinado sorotipo nas mucosas do hospedeiro pode determinar diferenças na capacidade para colonizar e infectar diferentes sítios do indivíduo (EDWARDS et al., 2003). Este fato e também a falta de imunidade do hospedeiro (KAO et al., 2004) podem justificar a ocorrência de infecção por apenas um sorotipo em alguns indivíduos, e a ocorrência de infecção pelos dois sorotipos em outros indivíduos.

De acordo com TENOVER et al., 1995, linhagens provenientes de surtos pertencem à mesma espécie e são epidemiologicamente relacionadas, uma vez que são isoladas num mesmo período, dentro da mesma área, e provenientes de

uma fonte comum de infecção. Tais isolados são clonalmente relacionados, apresentando os mesmos fenótipos e genótipos.

De acordo com estas definições e levando-se em conta os resultados obtidos neste trabalho, confirmou-se a ocorrência de um surto de faringite estreptocócica na indústria de produtos alimentícios, na cidade de Curitiba-PR, em março de 2004, com circulação de dois sorotipos no local. O isolado do primeiro paciente que apresentou sintomas de faringite seguida de glomerulonefrite agrupou-se com 18 isolados do surto, com similaridade genética de 100% por meio de marcadores RAPD. Sendo assim, estes isolados do Grupo I provavelmente eram de sorotipo nefritogênico, com possibilidade de pertencerem ao sorotipo M4, sugerindo a possível ocorrência de um surto de glomerulonefrite.

A utilização de marcadores moleculares RAPD mostrou ser uma ferramenta rápida, fácil, e menos onerosa do que outros marcadores moleculares e sorotipagem da proteína M, com boa capacidade de distinção de sorotipos diferentes, podendo ser utilizado em estudos epidemiológicos.

Uma vez que RAPD apenas faz a distinção entre os sorotipos, a tipagem do gene *emm* ou a sorotipagem da proteína M permitirá a identificação dos sorotipos envolvidos no surto. Isto possibilitará, em estudo futuro, o isolamento de bandas exclusivas de cada sorotipo, permitindo sua rápida identificação por PCR e utilização em diagnóstico.

A tipagem por HLA dos pacientes investigaria a suscetibilidade a determinados sorotipos, explicando as diferentes respostas às infecções.

5 CONCLUSÕES

- Foi verificada a ocorrência de um surto no local investigado, causado por linhagem nefritogênica, possivelmente a M4.
- Houve variabilidade genética entre os isolados de *S. pyogenes* provenientes do surto, constatada pela presença de dois grupos que não apresentaram relação clonal entre si, indicando que houve circulação de dois sorotipos de *S. pyogenes* no local investigado.
- A distribuição dos isolados não relacionados ao surto nos grupos I, II e III, mostrando variabilidade genética, sugere que houve circulação de mais de um sorotipo de *S. pyogenes* sendo disseminado na cidade de Curitiba, pelo menos na época da ocorrência do surto.
- Os marcadores RAPD mostraram-se eficientes na discriminação dos sorotipos envolvidos no estudo, podendo ser utilizados em estudos epidemiológicos como uma ferramenta rápida, fácil e menos onerosa que a sorotipagem da proteína M ou outros marcadores moleculares.

REFERÊNCIAS

ANAND, C.; GORDON, R.; SHAW, H.; FONSECA, K.; OLSEN, M. Pig and goat blood as substitutes for sheep blood in blood-supplemented ágar media. **Journal of Clinical Microbiology**, 38(2):591-594, Feb 2000.

BATZLOFF, M.; YAN, H.; DAVIES, M.; HARTAS, J.; GOOD, M. Preclinical evaluation of a vaccine based on conserved region of M protein that prevents group A streptococcal infection. **Indian Journal of Medical Research**, 119:104-107, May 2004.

BERT, F.; BRANGER, C.; LAMBERT-ZECHOVSKY, N. Pulsed-field gel electrophoresis is more discriminating than multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis for typing pyogenic streptococci. **Current Microbiology**, 34:226-229, 1997.

BRANDT, C. M.; HAASE, G.; SPELLERBERG, B.; HOLLAND, R.; LÜTTICKEN, R. DRS (Distantly related *sic*) Gene polymorphisms among *emm12*-type *Streptococcus pyogenes* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, 41(4):1794-1797, Apr 2003.

COELHO, A. S. G. 2005. Bood 3.03

CONLEY, J.; OLSON, M. E.; COOK, L. S.; CERI, H.; PHAN, V.; DAVIES, H. D. Biofilm formation by group A streptococci: is there a relationship with treatment failure? **Journal of Clinical Microbiology**. 41(9):4043-4048, Sept 2003.

COSTA, F. N.; SANTOS, O.; WECKX, L. L. M.; PIGNATARI, S. S. N. Microbiologic study of the core and surface of the tonsils in children with recurrent and hypertrophic tonsillitis. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. 69(2), Apr 2003.

COUSER, W. G. Glomerulonephritis. **The Lancet**, 353:1509, May 1999.

DOKTOR, S. Z.; BEYER, J. M.; FLAMM, R. K.; SHORTRIDGE, V. D. Comparison of *emm* typing and ribotyping with three restriction enzymes to characterize clinical isolates of *Streptococcus pyogenes*. **Journal of Clinical Microbiology**, 43(1):150-155, Jan 2005.

DYKSTRA, M. A.; McLAUGHLIN, J. C.; BARTLETT, R. C. Comparison of media and techniques for detection of group A streptococci in throat swab specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, 9(2):236-238, Feb 1979.

EDWARDS, M. L.; FAGAN, P. K.; SMITH-VAUGHAN, H.; CURRIE, B. J.; SRIPRAKASH, K. S. Strains of *Streptococcus pyogenes* from severe invasive infections bind Hep2 and HaCaT cells more avidly than strains from uncomplicated infections. **Journal of Clinical Microbiology**, 41(8):3936-3938, Aug 2003.

EFSTRATIOU, A. Group A streptococci in the 1990s. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 45:3-12, 2000.

ESPOSITO, S.; BLASI, F.; BOSIS, S.; DROGHETTI, R.; FAELLI, N.; LASTRICO, A.; PRINCIPI, N. Aetiology of acute pharyngitis: the role of atypical bacteria. **Journal of Medical Microbiology**, 53:645-651, 2004.

GERBER, M. A.; SHULMAN, S. T. Rapid diagnosis of pharyngitis caused by group A streptococci. **Clinical Microbiology Reviews**, 17(3):571-580, Jul 2004.

GERBER, M.A.; TANZ, R. R.; KABAT, W.; BELL, G. L.; SIDDIQUI, P. N., LERER, T. J.; LEPOW, M. L.; KAPLAN, E. L.; SHULMAN, S. T. Potential mechanisms for failure to eradicate group A streptococci from the pharynx. **Pediatrics**, 104(4):911-917, Oct 1999.

GIESEKER, K. E.; ROE, M. H.; MACKENZIE, T.; TODD, J. K. Evaluating the American Academy of Pediatrics Diagnostic Standard for *Streptococcus pyogenes* pharyngitis: backup culture versus repeat rapid antigen testing. **Pediatrics**, 111(6):666-670, Jun 2003.

GONZÁLEZ-REY, C.; BELIN, A. M.; JÖRBECK, H.; NORMAN, M.; KROVACEK, K.; HENRIQUES, B.; KÄLLENIUS, G.; SVENSON, S. B. RAPD-PCR and PFGE as tools in the investigation of an outbreak of beta-haemolytic *Streptococcus* group A in a Swedish hospital. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, 26:25-35, 2003.

GRUTEKE, P.; BELKUM, A.; SCHOULS, L. M.; HENDRIKS, D. H.; REUBSAET, F. A. G.; DOKTER, J.; BOXMA, H.; VERBRUGH, H. A. Outbreak of group A streptococci in a burn center: use of pheno-and genotypic procedures for strain tracking. **Journal of Clinical Microbiology**, 34(1):114-118, Jan 1996.

HAHN, R. G.; KNOX, L. M.; FORMAN, T.A. Evaluation of poststreptococcal illness. **American Family Physician**, Los Angeles, 71(10):1949, 2005.

JOHNSON, D. R.; WOTTON, J. T.; SHET, A.; KAPLAN, E. L. A comparison of group A streptococci from invasive and uncomplicated infections: are virulent clones responsible for serious streptococcal infections? **The Journal of Infectious Diseases**, 185(11):1586-1595, Jun 2002.

JOHNSTON, F.; CARAPETIS, J.; PATEL, M.; WALLACE, T.; SPILLANE, P. Evaluating the use of penicillin to control outbreaks of acute poststreptococcal glomerulonephritis. **The Pediatric Infectious Disease Journal**. 18(4):327-332, Apr 1999.

KAO, C. H.; CHEN, P. Y.; HUANG, F. L.; CHEN, C. W.; CHI, C. S.; LIN, Y. H.; SHIH, C. Y.; HU, B. S.; LI, C. R.; MA, J. S.; LAU, Y. J.; LU, K. C.; YU, H. W. Clinical and genetic analysis of invasive and non-invasive group A streptococcal infections in central Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, 38:105-111, 2005.

KAPLAN, E. L. Recent epidemiology of group A streptococcal infections in North America and abroad: an overview – Group A streptococcal infections: proceedings of a conference held January 20-22, 1995, in Tampa, Florida. **Pediatrics**, June 1996.

KAPLAN, E. L., JOHNSON, D. R. Unexplained reduced microbiological efficacy of intramuscular benzathine penicillin G and of oral penicillin V in eradication of group A streptococci from children with acute pharyngitis. **Pediatrics**, 108(5):1180-1186, Nov 2001.

KAPLAN, E. L.; SHET, A. Addressing the burden of group A streptococcal disease in India. **The Indian Journal of Pediatrics**, 71(1):41-48, 2004.

KAPLAN, E. L.; WOTTON, J. T.; JOHNSON, D. R. Dynamic epidemiology of group A streptococcal serotypes associated with. **The Lancet**, 358:1334-1337, Oct 2001.

KHANDKE, K. M.; FAIRWELL, T.; MANJULA, B. N. Difference in the structural features of streptococcal M proteins from nephritogenic and rheumatogenic serotypes. **Journal of Experimental Medicine**, 166:151-162, Jul 1987.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. **Diagnóstico Microbiológico**. 5ª edição. 2001. MEDSI Editora Médica e Científica Ltda. Rio de Janeiro – RJ, p. 589-614.

LAU, S. K. P.; WOO, P. C. Y.; YIM, T.; TO, A. P. C.; YUEN, K. Molecular characterization of a strain of group A *Streptococcus* isolated from a patient with a psoas abscess. **Journal of Clinical Microbiology**, 41(10):4888-4891, Oct 2003.

MALHOTRA KUMAR, S.; WANG, S.; LAMMENS, C.; CHAPELLE, S.; GOOSSENS, H. Bacitracin-resistant clone of *Streptococcus pyogenes* isolated from pharyngitis patients in Belgium. **Journal of Clinical Microbiology**, 41(11):5282-5284, Nov. 2003.

MARGIE, P. 'Strep' demands immediate care. **FDA Consumer**, 25(8):24-29, 1991.

MELO, M. C. N.; FIGUEIREDO, A. M. S.; CARVALHO, B. T. F. Antimicrobial susceptibility patterns and genomic diversity in 1978-1997 in different brazilian cities. **Journal of Medical Microbiology**, 52:251-258, 2003.

MENON, T.; SHANMUGASUNDARAM, S.; KUMAR, M. P.; KUMAR, C. P. G. Group A streptococcal infections of the pharynx in a rural population in south India. **Indian Journal of Medical Research**, 119:171-173, May 2004.

MICHEL, R. S.; HAYDEN, G. F.; HENDLEY, J. O. Pharyngitis in children: when to culture, when to treat. **Consultant**, 35(10):1469-1477, Oct 1995.

MICHELI, M. R.; BOVA, R.; PASCALE, E.; D'AMBROSIO, E. Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. **Nucleic Acids Research**, 22(10):1921-1922, 1994.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, p.1661-1669, June 1999.

OLIVEIRA, D. B. G. Poststreptococcal glomerulonephritis: getting to know an old enemy. **Clinical and Experimental Immunology**, 107(1):8-10, Jan 1997.

OLIVIER, A. Rheumatic fever – is still a problem? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 45:13-21, 2000.

OSTERLUND, A.; ENGSTRAND, L. DNA fingerprinting of *Streptococcus pyogenes* from patients with recurrent pharyngotonsillitis by means of random amplified polymorphic DNA analysis. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, 27:119-121, 1995.

PEREA-MEJÍA, L. M.; INZUNZA-MONTIEL, A. E.; CRAVIOTO, A. Molecular characterization of group A *Streptococcus* strains isolated during a scarlet fever outbreak. **Journal of Clinical Microbiology**, 40(1):278-280, Jan 2002.

PEREIRA, M. S. V.; LEAL, N. C.; SOBREIRA, M.; ALMEIDA, A. M. P.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Typing of human bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and ribotyping-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, 35:32-36, 2002.

PRESTES-CARNEIRO, L. E.; ACÊNCIO, E. S. L.; POMPEI, A. C. S. C. Determination of antistreptolysin “O” and C-reactive protein among school children of Laranjal-PR. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 38(1), Jan/Feb 2005.

ROHLF, F. J. **NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York, Exeter Publishing, 1988.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2^a ed. CSH Press, 1989.

SANZ, J. C.; BASCONES, M. A.; MARTIN, F.; SAEZ-NIETO, J. A. Recurrent scarlet fever due to recent reinfection caused by strains unrelated to *Streptococcus pyogenes*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 23:388-389, 2005.

SCALABRIN, R.; BUSS, G. D.; IAMAGUCHI, K. C. S.; CARDOSO, C. L.; GARCIA, L. B. Isolation of *Streptococcus pyogenes* in individuals with pharyngotonsillitis and antimicrobial susceptibility testing. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. 69(6), Dec 2003.

SCHWEON, S.; NOVATNACK, E. Don't underestimate group A strep. **Alberta Association of Registered Nurses**, 66(8):28-32, Aug 2003.

SCOTT, M. P.; HAYMES, K. M.; WILLIAMS, S. M. Parentage analysis using RAPD PCR. **Nucleic Acids Research**, 20(20):5493, Jul 1992.

SEPPÄLA, H.; HE, Q.; ÖSTERBLAD, M.; HUOVINEN, P. Typing of group A streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, 32(8):1945-1948, Aug 1994.

SINGLE, L. A.; MARTIN, D. R. Clonal differences within M-types of the group A *Streptococcus* revealed by pulsed-field gel electrophoresis. **FEMS Microbiology Letters**, 91:85-90, 1992.

SMOOT, J. C.; KORGESKI, E. K.; DALY, J. A.; VEASY, L. G.; MUSSER, J. M. Molecular analysis of group A *Streptococcus* type *emm* 18 isolates temporally associated with acute rheumatic fever outbreaks in Salt Lake City, Utah. **Journal of Clinical Microbiology**, 40(5):1805-1810, May 2002.

SPOLIDORIO, D. M. P.; HÖFLING, J. F.; PIZZOLITTO, A. C.; ROSA, E. A.; NEGRINI, T. C.; SPOLIDORIO, L. C. Genetic polymorphism of *Streptococcus mutans* in brazilian family members. **Brazilian Journal of Microbiology**, 34(3), 2003.

STEININGER, C., ALLERBERGER, F., GNAIGER, E. Clinical significance of inhibition kinetics for *Streptococcus pyogenes* in response to penicilin. **Journal of Antimicrobial Chemoterapy**. 50:517-523, 2002.

STEP, P.; ROBERTS, M. C.; GOLDOFT, M.; KOBAYASHI, J. Use of pulsed-field gel electrophoresis for investigation of a cluster of invasive group A streptococcal illness – Spokane, Washington, 1999. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, 48:681-683, Aug 1999.

STEVENS, D. L. Skin and soft tissue infections: cellulitis, fasciitis, and myonecrosis. **Consultant**, 44(5):694-700, 2004.

STOLLERMAN, G. H. Can we eradicate rheumatic fever in the 21st century? **Indian Heart Journal**, 53(1):25-34, Jan/Feb 2001.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, 33(9):2233-2239, Sep 1995.

TYRRELL, G. J.; LOVGREN, M.; FORWICK, B.; HOE, N. P.; MUSSER, J. M.; TALBOT, J. A. M types of group A streptococcal isolates submitted to the national center for *Streptococcus* (Canada) from 1993 to 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, 40(12):4466-4471, Dec 2002.

VICENTE, V. A. **Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose**. Piracicaba, SP. 2000. Tese de doutoramento. Universidade de São Paulo. 164 p.

VINEN, C. S.; OLIVEIRA, D. B. G. Acute glomerulonephritis. **Postgraduate Medical Journal**, 79:206-213, 2003.

YAN, J. J.; LIU, C. C.; KO, W. C.; HSU, S. Y.; WU, H. M.; LIN, Y. S.; LIN, M. T.; CHUANG, W. J.; WU, J. J. Molecular analysis of group A streptococcal isolates associated with scarlet fever in southern Taiwan between 1993 and 2002. **Journal of Clinical Microbiology**, 41(10):4858-4861, Oct 2003.

ANEXOS

ANEXO I – MEIOS DE CULTURA

1. Caldo BHI (Brain heart infusion) – Infusão de Cérebro e Coração – marca Biobrás

ANEXO II - SOLUÇÕES E REAGENTES

1. Clorofórmio-álcool isoamílico (CIA)

Clorofórmio	98 ml
Álcool isoamílico	2 ml

2. DNA polimerase

Foi utilizada a *Taq* DNA polimerase da marca Invitrogen, na concentração de 5U/ μ l, para as reações de amplificação.

3. Gel de Agarose 0,8%

Agarose	0,64g
Tampão TEB 1x	80 ml

4. Gel de agarose 1,4%

Agarose	4,2g
Tampão TEB 1x	300 ml

5. Glicerol 40%

Água ultrapura	60 ml
Glicerol	40 ml
60 ml	
40 ml	

A solução foi autoclavada por 15 min/120⁰C.

6. Solução de Brometo de Etídio

De acordo com SAMBROOK et al., 1989, foram dissolvidos 1,0% (p/v) de brometo de etídio em água destilada, agitando-se por várias horas. Esta solução foi

armazenada à temperatura ambiente. Para a revelação do gel foram diluídos 3µl a 100µl de água destilada.

7. Tampão de corrida TBE 10x pH 8,3

Tris-base	55g
Ácido bórico	9,3g
EDTA	Água ultrapura
108g	qsp 1000 ml

Cada componente foi dissolvido separadamente sob aquecimento, completando-se o volume para 1000 ml. A solução foi autoclavada e armazenada a temperatura ambiente.

8. Tampão CTAB de extração de DNA

Tris-base	Água ultrapura
NaCl	2,42g
Na-EDTA	8,2g
CTAB	0,74g
2,0g	qsp 1000 ml

Os sais foram dissolvidos em 80 ml de água ultrapura e o pH foi ajustado a 7,5. O volume foi completado para 1000 ml. A solução foi autoclavada por 15 min e conservada a temperatura ambiente.

9. Tampão Tris-EDTA (TE)

Tris Base	0,129g
Na-EDTA	0,04g
Água ultrapura	qsp 100 ml

Os sais foram dissolvidos em 80 ml de água ultrapura e o pH foi ajustado a 8,0. O volume foi completado para 100 ml. A solução foi autoclavada por 15 min e conservada a temperatura ambiente.

10. Tubos de microcentrífuga com sílica e celite

Foram preparados tubos de microcentrífuga com uma mistura de sílica e celite. A sílica foi triturada em cadinho de porcelana. Uma parte de celite foi homogeneizada com duas partes de sílica e esta mistura foi colocada nos tubos de microcentrífuga (ocupando cerca de 0,5 cm do tubo), que foram autoclavados por 15 min.

11. Estoque

Todas as linhagens foram congeladas a -80°C em meio BHI com glicerol 40% na proporção de 1:1.

ANEXO III – ARTIGO A SER SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO

GENETIC VARIABILITY AMONG ISOLATES OF *Streptococcus pyogenes* USING RAPD MARKERS

Juliana Noschang^{1*}; Ilma Hiroko Higuti¹; Vânia Aparecida Vicente¹; Chirlei Glienke²; Rosângela Stadnick Lauth de Almeida Torres³

¹Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná; ²Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná; ³LACEN-Laboratório Central do Estado

ABSTRACT

The group A β -hemolytic streptococci (*Streptococcus pyogenes*) cause a variety of human diseases. These bacteria are also associated with rheumatic fever and post-streptococcal glomerulonephritis. Although serotyping of M and T-type antigens has been the most common method to type these pathogens, this approach is unsatisfactory because 15 to 40% of the isolates cannot be typed. In addition, these serotyping methods are not efficient for clonal differentiation in epidemiological studies. Molecular markers are important tools to allow the differentiation of group A streptococci, providing information to investigate epidemiological outbreaks, as well as diagnostics. RAPD markers were used in the present study to detect polymorphism among isolates of *S. pyogenes* from an outbreak of pharyngotonsillitis in March of 2004 in a food processing industrial facility in Curitiba, State of Paraná, Southern Brazil. Analyses included 26 isolates from the outbreak, 11 isolates from the same species that were unrelated to the outbreak, two reference strains from the nephritogenic serotype, and one reference strain from the rheumatogenic serotype. Genetic variability was detected among the outbreak isolates of *S. pyogenes*. A cluster analysis using the Jaccard coefficient resulted in two non-clonal groups, indicating that more than one serotype was present during the outbreak. In addition, the results suggest that the outbreak was caused by the nephritogenic serotype (possibly M4). The use of a large number of nephritogenic and rheumatogenic reference strains, as well as M protein serotyping, would allow the identification of the serotypes that caused the outbreak of streptococcal glomerulonephritis in Curitiba.

Key words: Streptococcal glomerulonephritis, RAPD, *Streptococcus pyogenes*, genetic variability.

* Corresponding author. Mailing address: E-mail: ihhiguti@ufpr.br Phone number/fax: 55 41 3264-8578

VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Streptococcus pyogenes* POR MEIO DE MARCADORES RAPD

Juliana Noschang^{1*}; Ilma Hiroko Higuti¹; Vânia Aparecida Vicente¹; Chirlei Glienke²; Rosângela Stadnick Lauth de Almeida Torres³

¹Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná; ²Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná; ³LACEN-Laboratório Central do Estado

RESUMO

Os estreptococos β -hemolíticos do grupo A (*Streptococcus pyogenes*) causam várias doenças humanas e estão associados com febre reumática e glomerulonefrite pós-estreptocócica. A sorotipagem dos antígenos M e T tem sido a maneira mais comum de tipagem destes patógenos, entretanto, para alguns isolados a tipagem por este método não é satisfatória, pois cerca de 15 a 40% dos isolados não são tipáveis. Além disso, estes métodos de sorotipagem não são eficientes para diferenciação clonal em estudos epidemiológicos. Marcadores moleculares são ferramentas importantes capazes de diferenciar sorotipos de estreptococos do grupo A, provendo informações na elucidação de surtos epidemiológicos e diagnóstico. Marcadores RAPD foram utilizados para detectar polimorfismos em isolados de *S. pyogenes* de um surto de faringotonsilite estreptocócica ocorrido em uma indústria alimentícia, em março de 2004 na cidade de Curitiba - PR. Foram utilizados 26 isolados do surto, 11 isolados desta espécie, não relacionados com o surto, duas linhagens referências de sorotipo nefritogênico e uma de sorotipo reumatogênico. Foi observada variabilidade genética entre os isolados de *S. pyogenes* do surto. A análise de "cluster" utilizando-se o coeficiente de Jaccard, mostrou dois grupos de isolados sem relação clonal entre si, sugerindo a circulação de dois sorotipos na indústria alimentícia. Os resultados sugerem que o surto foi causado por sorotipo nefritogênico, com possibilidade de ter sido o sorotipo M4. A utilização de mais linhagens referências nefritogênicas e reumatogênicas e a sorotipagem da proteína M possibilitariam a identificação dos sorotipos causadores do surto de glomerulonefrite estreptocócica na indústria alimentícia, em Curitiba-PR, naquela ocasião.

Palavras chaves: glomerulonefrite estreptocócica, RAPD, *Streptococcus pyogenes*, variabilidade genética.

* Corresponding author. Mailing adress: E-mail: ihhiguti@ufpr.br Phone number/fax: 55 41 3264-8578

INTRODUCTION

Lancefield group A β -hemolytic streptococci, *Streptococcus pyogenes*, are responsible for causing a variety of diseases, including streptococcal pharyngitis, pyodermitis, erisipela, scarlatin, cellulitis, necrotizing fasciitis, toxic shock syndrome, rheumatic fever, and post-streptococcal glomerulonephritis (9).

The variability in its main virulence factor, the M protein, is used to classify these streptococci into different serotypes (the M serotypes). For instance, rheumatic fever is caused by the rheumatogenic serotypes, whereas the nephritogenic serotypes cause post-streptococcal glomerulonephritis. The identification of these serotypes is important for epidemiological, pathogenic, and therapeutic studies of the infections caused by *S. pyogenes* (5,8,16,17). Although serotyping T and M antigens is the standard method for the identification of serotypes of type A, there are strains that cannot be typed using this method due to the lack of specific antisera. Molecular markers, such as RAPD, are capable of differentiating among group A serotypes, as well as identifying strains within the same serotype, being widely used in epidemiological studies due to the straightforward protocols, speed, and lower cost than serotyping the M protein (1,3,11,16,20).

In this context, the present study used RAPD molecular markers to assess the genetic variability among isolates of *S. pyogenes* in an outbreak of streptococcal glomerulonephritis.

MATERIALS AND METHODS

Samples

A total of 26 isolates were obtained from an outbreak of streptococcic pharyngotonsillitis (indicated by O and O' - outbreak) in March of 2004 in a food processing industrial facility in Curitiba, State of Paraná, Southern Brazil, as well as 11 isolates of *S. pyogenes* (indicated by NO – not outbreak) that were unrelated to the incident to be used as the outgroup. All isolates were identified by the Laboratório Central do Estado (LACEN - State of Paraná). Three additional reference strains were included in the analysis: an M18 rheumatogenic serotype obtained from the ATCC collection (ATCC BAA-572) and two nephritogenic serotypes (M4 and M49, ATCC12385 and ATCC 13540, respectively), all of which provided by LACEN.

DNA extraction

The DNA extraction was carried out according to the protocol described by VICENTE (19), followed by spectrophotometric quantification (260 nm) and an assessment of integrity by agarose gel electrophoresis (0.8%), with ethidium bromide staining and visualization under UV light.

DNA amplification

The conditions for DNA amplification used in the present study are described in PEREIRA *et al.* (12). The 15 µl reaction medium contained 1.5 units of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 0.4 mmoles/l of each dNTP, 4 mmoles/l of MgCl₂, 0.4 mmoles/l of primer, 10 mmoles/l of 1X enzyme buffer, and 12 ng of template DNA.

Thermocycler conditions were based on the protocol of SPOLIDORIO *et al.* (18). An initial denaturation at 94°C for 5 min was followed by 40 cycles of 30s at 94 °C, 30s at 36 °C, and 1 min at 72°C, with a final extension at 72 °C for 3 min.

After amplification, the PCR products were subject to agarose gel electrophoresis (1.4%) at a voltage of 104V. The size standard was a 100 bp DNA ladder. The gel was stained with ethidium bromide and photographed under UV light. The primers used in the present study are shown in Table 1.

Analysis of polymorphism using RAPD

The analysis of the genetic variability was carried out using the software NTSYSpc 2.1 (*Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs*) (13). The hierarchical UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) was used to group the strains and build the dendrogram. The software Bood 3.03 (2) was used for a bootstrap analysis, which estimates the reliability of the groupings of the generated dendrogram, using 10,000 resampling replicates.

RESULTS AND DISCUSSION

In March of 2004, several employees of food processing industrial facility in Curitiba, State of Paraná, showed similar symptoms over the same period of time, thus characterizing an outbreak of streptococcic pharyngotonsillitis. The oropharyngeal secretion of these employees was collected, and the identification of the group A streptococci was conducted by LACEN. After DNA extraction and amplification using the primers described in Table 1, a total of 32 reliable bands was generated. The amplification profile of the primer OPA 9 is shown in Figure 1.

The isolates obtained from the outbreak were separated into two groups (group I and II), indicating that the outbreak was caused by two different serotypes (Figure 2). Group I was composed of 19 outbreak isolates and six unrelated isolates, with 100% genetic similarity among them. Group II included seven outbreak isolates and two unrelated isolates, with 100% genetic similarity between them. Group I had 95% genetic similarity with the M4 nephritogenic reference strain (ATCC 12385). This similarity, combined with the fact that one of the isolates (S9) was obtained from a patient that showed glomerulonephritis, suggests the nephritogenic nature of these isolates.

Some of the isolates that were unrelated to the outbreak were distributed between groups I and II (six in group I and two in group II), and three formed a third group (group 3) (Figure 2), showing genetic variability among each other and contrasting with the other groups, indicating their independent origin. The inclusion of these isolates in groups I and II indicates that they had been present in the region of Curitiba, at least at the time of the outbreak. This is reasonable, given that this microorganism is easily transmitted through the air and is capable of causing outbreaks, which are more likely when potential hosts are present in high densities and when the individual is symptomatic (7,10,15). Therefore, it is possible that more than one serotype is being transmitted within the same region. Similar results have been obtained previously using RAPD markers, with more than one serotype of *S. pyogenes* being found on the same population, as well as the infection of both serotypes on the same patient (4,6,14).

The use of principal components analysis (PCA) showed a better discrimination between groups I, II, and III (Figure 3). In addition, strains M4, M49 and group I were shown to be more similar to one another than to group II. The

principal components analysis suggests that isolates NS31, NS36, and NS37 could be of a rheumatogenic nature (Figure 3).

Isolates from a second sampling of eight patients that showed persistent pharyngotonsillitis symptoms after being treated were also included in the present study. Part of the isolates remained within the same groups as in their previous samples, whereas others were relocated to different groups: two out of three patients that had received antibiotic treatment remained with bacteria of the same serotype indicating treatment failure, whereas the remaining patient was infected by both serotypes (Table 2). Also, three of the five patients that did not follow antibiotic treatment still showed an infection of the same serotype, whereas the other two patients were found to harbor different serotypes. It is possible that the patients with infections by both serotypes could have been originally multiply-colonized, but had different serotypes isolated in each sampling effort.

Based on the results obtained, the outbreak detected in the case study was caused by a nephritogenic strain, possibly M4. There was genetic variability among isolates of *S. pyogenes* from the outbreak based on the presence of two groups that did not show clonal relationships to each other, suggesting the existence of two serotypes of *S. pyogenes* in this event. The distribution of isolates unrelated to the outbreak into groups I, II, and III indicates the presence of more than one serotype of *S. pyogenes* being spread in the city of Curitiba, at least at the time of the occurrence of the outbreak. The use of a large number of nephritogenic and rheumatogenic reference strains, as well as the serotyping of the M protein, would allow the identification of the serotypes of the outbreak isolates. The RAPD markers were efficient in the discrimination of the different serotypes involved in the present study, and thus represent a rapid and cheaper

alternative to the M protein serotyping method. The isolation of exclusive bands from each serotype will allow the rapid identification by PCR for diagnose uses. In order to do that, it is necessary yet to confirm the separation of the isolates into M4, M49, and M18 by the serotyping of the M protein.

REFERENCES

1. BERT, F.; BRANGER, C.; LAMBERT-ZECHOVSKY, N. Pulsed-field gel electrophoresis is more discriminating than multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis for typing pyogenic streptococci. *Current Microbiol*, 34:226-229, 1997.
2. COELHO, A. S. G. 2005. *Software Bood* 3.03
3. GONZÁLEZ-REY, C.; BELIN, A. M.; JÖRBECK, H.; NORMAN, M.; KROVACEK, K.; HENRIQUES, B.; KÄLLENIUS, G.; SVENSON, S. B. RAPD-PCR and PFGE as tools in the investigation of an outbreak of beta-haemolytic *Streptococcus* group A in a Swedish hospital. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 26:25-35, 2003.
4. GRUTEKE, P.; BELKUM, A.; SCHOULS, L. M.; HENDRIKS, D. H.; REUBSAET, F. A. G.; DOKTER, J.; BOXMA, H.; VERBRUGH, H. A. Outbreak of group A streptococci in a burn center: use of pheno-and genotypic procedures for strain tracking. *J. Clin. Microbiol.*, 34(1):114-118, 1996.
5. JOHNSON, D. R.; WOTTON, J. T.; SHET, A.; KAPLAN, E. L. A comparison of group A streptococci from invasive and uncomplicated infections: are virulent clones responsible for serious streptococcal infections? *J. Infect. Dis.*, 185:1586-1595, 2002.
6. KAPLAN, E. L.; WOTTON, J. T.; JOHNSON, D. R. Dynamic epidemiology of group A streptococcal serotypes associated with. *Lancet*, 358:1334-1337, 2001.
7. KAPLAN, E. L.; SHET, A. Addressing the burden of group A streptococcal disease in India. *Indian J. Pediatr.*, 71:41-48, 2004.
8. KHANDKE, K. M.; FAIRWELL, T.; MANJULA, B. N. Difference in the structural features of streptococcal M proteins from nephritogenic and rheumatogenic serotypes. *J. Experimental Med.*, 166:151-162, 1987.
9. KONEMAN, E. W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W. C. *Diagnóstico Microbiológico*. MEDSI Editora Médica e Científica Ltda. Rio de Janeiro – RJ, 2001.
10. OLIVIER, A. Rheumatic fever – is still a problem? *J. Antimicrob. Chemother*, 45:13-21, 2000.
11. ÖSTERLUND, A.; ENGSTRAND, L. DNA fingerprinting of *Streptococcus pyogenes* from patients with recurrent pharyngotonsillitis by means of random amplified polymorphic DNA analysis. *Scand. J. Infect. Dis.*, 27:119-121, 1995.

12. PEREIRA, M. S. V.; LEAL, N. C.; SOBREIRA, M.; ALMEIDA, A. M. P.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Typing of human bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and ribotyping-PCR. *Let. in Appl. Microbiol.*, 35:32-36, 2002.
13. ROHLF, F. J. *NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. New York, Exeter Publishing, 1988.
14. SANZ, J. C.; BASCONES, M. A.; MARTÍN, F.; SÁEZ-NIETO, J. A. Recurrent scarlet fever due to recent reinfection caused by strains unrelated to *Streptococcus pyogenes*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 23:388-389, 2005.
15. SCHWEON, S.; NOVATNACK, E. Don't underestimate group A strep. *RN* 66, (8):28-32, 2003.
16. SEPPÄLA, H.; HE, Q.; ÖSTERBLAD, M.; HUOVINEN, P. Typing of group A streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 32(8):1945-1948, 1994.
17. SINGLE, L. A.; MARTIN, D. R. Clonal differences within M-types of the group A *Streptococcus* revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.*, 91:85-90, 1992.
18. SPOLIDORIO, D. M. P.; HÖFLING, J. F.; PIZZOLITTO, A. C.; ROSA, E. A.; NEGRINI, T. C.; SPOLIDORIO, L. C. Genetic polymorphism of *Streptococcus mutans* in brazilian family members. *Braz. J. Microbiol.*, 34(3):213-217, 2003.
19. VICENTE, V. A. *Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose*. Piracicaba - SP, 2000, 164 p. (Tese de doutoramento, USP).
20. YAN, J. J.; LIU, C. C.; KO, W. C.; HSU, S. Y.; WU, H. M.; LIN, Y. S.; LIN, M. T.; CHUANG, W. J.; WU, J. J. Molecular analysis of group A streptococcal isolates associated with scarlet fever in southern Taiwan between 1993 and 2002. *J. Clin. Microbiol.*, 41(10):4858-4861, 2003.

Table 1 – Primer sequences used in RAPD analyses.

<i>Primer</i>	Sequence
OPA 1	5'-CAGGCCCTTC-3'
OPA 2	5'-TGCCGAGCTG-3'
OPA 9	5'-GGGTAACGCC-3'
OPA 13	5'-CAGCACCCAC-3'

Table 2 – Isolates used in the first and second samplings (obtained in May 4, 2004 and April 26, 2004, respectively) and their groups based on the cluster analysis. See text for details.

Isolates (Sampling 1)	Group	Time of treatment	Isolates (Sampling 2)	Group
S1	I	04/07/04	S1'	II
S5	I	Did not follow	S5'	II
S7	I	04/07/04	S7'	I
S8	I	Did not follow	S8'	I
S13	I	Did not follow	S13'	I
S14	II	Did not follow	S14'	I
S16	I	04/12/04	S16'	I
S17	I	Did not follow	S17'	I

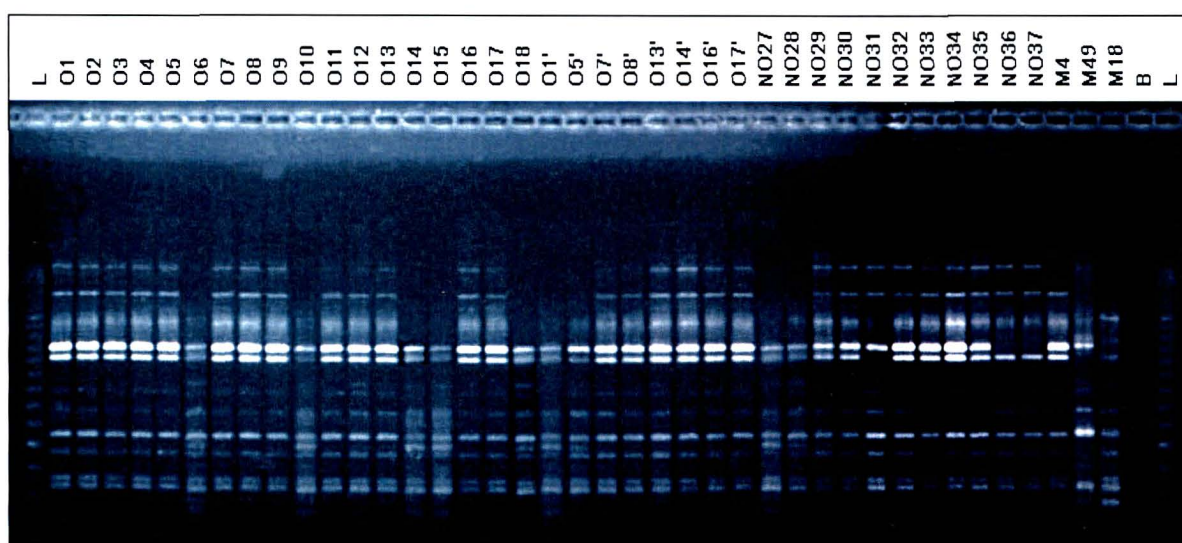


Figure 1 - Photographic amplification profile of isolates of *S. pyogenes* using the OPA 9 primer. L: 100 bp ladder, B: negative control, S: isolates obtained during the outbreak, NS: isolates unrelated to the outbreak, M4 and M49: nephritogenic reference strains, M18: rheumatogenic reference strain.

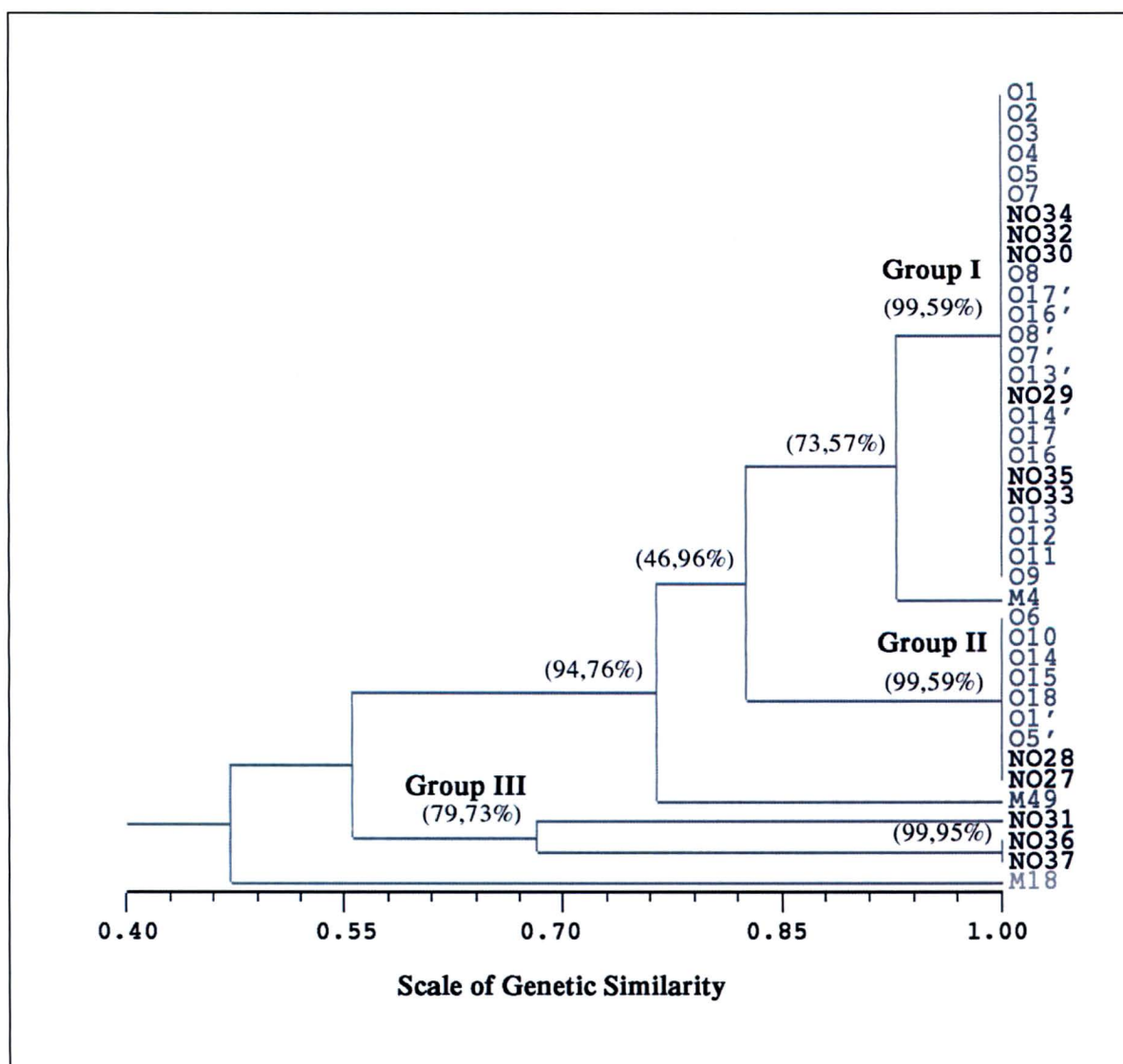


Figure 2 – Dendrogram plot describing the genetic similarity among isolates of *S. pyogenes* based on RAPD markers and using the UPGMA clustering method. Isolate labels: (S) isolates obtained during the outbreak; (NS) isolates unrelated to the outbreak; M4 and M49 (nephritogenic reference strains); and (M18) rheumatogenic reference strain. Bootstrap values are shown in parenthesis.

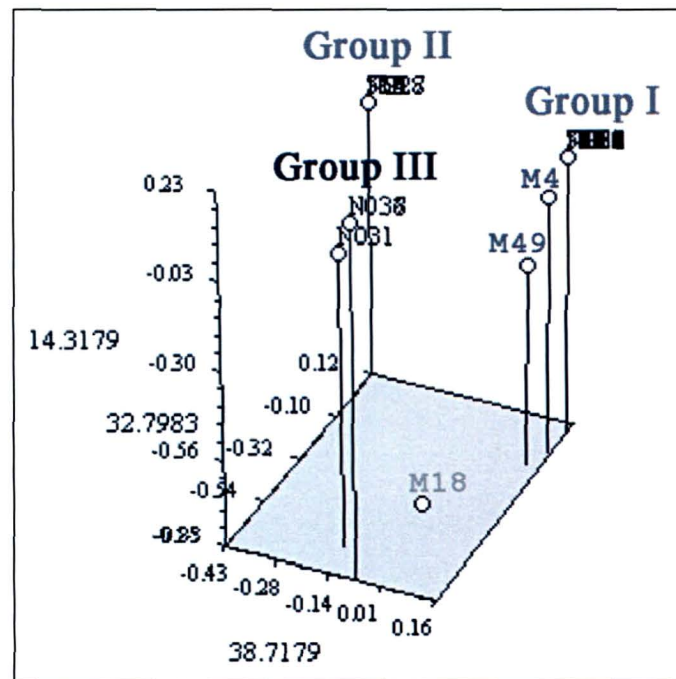


Figure 3 – Dimensional plot indicating the results from a principal components analysis (PCA) of the isolates of *S. pyogenes*. Groups I and II: outbreak isolates; NS31, NS36, and NS37: isolates unrelated to the outbreak; M4 and M49 reference nephritogenic strains, M18 reference rheumatogenic strain.